

Institut für Pflanzenkrankheiten  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

---

**Resistenzinduktion und Pathogenabwehr durch *Reynoutria  
sachalinensis*-Extrakt und Phycion:  
Signalkette im Vergleich zu systemischen Induktoren und  
Beziehungen zur Hypersensitiven Reaktion**

**Inaugural-Dissertation**  
zur  
Erlangung des Grades  
Doktor der Agrarwissenschaften  
(Dr. agr.)  
der  
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt am 18. Dezember 2002

von

**Dipl.-Ing. agr. Susanne Müller**  
aus Mönchengladbach

## **Kurzfassung - Susanne Müller**

### **Resistenzinduktion und Pathogenabwehr durch *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt und Physcion: Signalkette im Vergleich zu systemischen Induktoren und Beziehung zur Hypersensitiven Reaktion.**

Der heutige Stand der Forschung zeigt, daß die Vorgänge der Induzierten Resistenz (IR) bei Pflanzen relativ spezifisch in bezug auf verschiedene Induktoren, Wirtspflanzen und Pathogene sind. Neben vielen bekannten chemischen Induktoren liegt mit dem Extrakt aus *Reynoutria sachalinensis* ein natürlicher Resistenzinduktor vor, der sich insbesondere gegen Echte Mehltapilze als hochwirksam erwies. Physcion, ein Anthrachinon, konnte bis zu diesem Zeitpunkt als eine bedeutende Wirksubstanz in diesem Extrakt nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den chemischen Induktoren wirkt *Reynoutria*-Extrakt und Physcion nicht systemisch, sondern lokal. Das Ziel dieser Arbeit war es, wichtige Glieder der Signaltransduktionskette des Induktors *R. sachalinensis* und von Physcion mit denen systemischer Induktoren (DCINA, DCSA, Bion) zu vergleichen, wobei Untersuchungen in den Systemen *Cucumis sativus* / *Sphaerotheca fuliginea* und *Hordeum vulgare* / *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* durchgeführt wurden, um Unterschiede bzw. Übereinstimmungen in den Signalketten monokotyledoner und dikotyledoner Pflanzen ermitteln zu können. Anknüpfend an vorangegangene Arbeiten wurde der erste Arbeitsschwerpunkt auf die Beurteilung der Bedeutung von  $H_2O_2$  in der Signalkette von *R. sachalinensis* und Physcion gelegt. Zu diesem Zweck wurden sowohl  $H_2O_2$ -Hemmstoffe und Antioxidantien als auch Wasserstoffperoxidbildner in verschiedenartigen Biotests eingesetzt. Aufgrund ihrer pos./neg. Wirkungsweise wurden die ersten Erklärungsansätze zur induzierenden Wirkung des Extrakts geliefert. Weiterhin wurden Methoden angewandt, die es erlaubten,  $H_2O_2$  im Gewebe zu lokalisieren und quantitativ zu bestimmen. Deren Aussagen unterstützten das Vorhandensein eines oxidativen Bursts. Desweiteren wurden noch zwei andere Sauerstoffverbindungen, das Superoxidanion und das Stickoxid, in die Untersuchungen einbezogen.  $O_2^-$  stellte dabei anscheinend eine Vorstufe zur  $H_2O_2$ -Bildung dar, NO wurde eine Signalfunktion zugeschrieben und es konnte mit Elementen des aktivierten  $H_2O_2$ -Stoffwechsels reagieren. Zur Klärung der an der Abwehrreaktionen beteiligten Enzyme wurden  $H_2O_2$ -aufbauende wie -abbauende und an den  $H_2O_2$ -Stoffwechsel anknüpfende Enzyme betrachtet und ihre Aktivität konnte z. T. mit dem oxidativen Burst in Verbindung gebracht werden. Ergänzend dazu wurde im API-ZYM-System die Beteiligung anderer Enzymgruppen außerhalb des  $H_2O_2$ -Metabolismus geprüft. Ansatzweise konnte von ausgewählten Enzymen deren Isoformen mittels isoelektrischer Fokussierung ermittelt werden. Strukturelle und biochemische Arbeiten sollten die Abwehrreaktionen des Wirtsgewebes aufzeigen. Die in Verbindung mit der Induzierten Resistenz bekannten histologischen Veränderungen im Pflanzengewebe und innerhalb der Pathogenentwicklung sind in Form von einzelnen Parametern wie Hypersensitive Reaktion, Autofluoreszenz, Papillenbildung,  $H_2O_2$ -Bildungsorte etc. qualitativ und quantitativ beobachtet worden. Durch den Einsatz von Vital- als auch Letalfarbstoffen wurde die Hypothese überprüft, ob es sich bei der induzierenden Wirkung des Extrakts um eine Art von unterschwelliger HR handelt. Erneut wurde auch eine mögliche direkte Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts auf den Infektionsverlauf von Mehltau untersucht. Keimfähigkeitstests mit unterschiedlichen Pathotypen von Gurkenmehltau und Messungen des Blattoberflächenmilieus gaben dazu Auskunft. Zur Beantwortung der Frage nach weiteren induzierten oder direkt wirkenden Inhaltsstoffen des Extrakts konnten phenolische Verbindungen nachgewiesen werden.

## **Abstract - Susanne Müller**

### **Induced resistance and pathogenic defence by *Reynoutria sachalinensis*-extract and Physcion: signal pathway in comparison with systemic inducers and relationship to hypersensitive reactions.**

Recently it became obvious that Induced Resistance (IR) in plants proved to be specific for different inducers, for different host plants and against different pathogens. Beneath many known chemical inducers the extract of *Reynoutria sachalinensis* is a biological one, which is efficacious against downy mildew infections. Physcion, an anthraquinone, could be established as an important active substance in this extract up to this day. In contrast to chemical activators the signal by *Reynoutria*-extract and Physcion is not systemic, but the induction is locally restricted. The aim of this thesis was to compare significant properties of the signal pathway of *Reynoutria sachalinensis* and Physcion with those of systemic inducers (DCINA, DCSA, Bion) in two host-parasite relationships, *Cucumis sativus* / *Sphaerotheca fuliginea* and *Hordeum vulgare* / *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, to find out differences and/or conformities in monocotyledons and dicotyledons. Continuing former experiments, the first focal point was to investigate the important role of  $H_2O_2$  in the signal pathway of *R. sachalinensis* and Physcion. Therefore  $H_2O_2$ -inhibitors and scavengers on the one hand and  $H_2O_2$ -producers on the other were set in different biological assays. Because of their positive / negative mode of action the first explaining steps of the inducing effect were given. Furthermore methods were used to localize and to quantify  $H_2O_2$  in plant tissue. These results support the presence of an oxidative burst. Two others significant oxygen radicals, named superoxide anion and nitric oxide, were embraced in these investigations.  $O_2^-$  represented a kind of first step for the  $H_2O_2$ -formation apparently, NO could act as a signal and react with elements of the activated  $H_2O_2$ -metabolism. In order to study the peroxide metabolism  $H_2O_2$ -building and  $H_2O_2$ -reducing enzymes were analysed. Their activities could connected with the oxidative burst partly. Complementary to it enzymes outside the  $H_2O_2$ -metabolism were screened in the API-ZYM-system and isoforms of some selected enzymes were determined by gel electrophoresis. Structural and biochemical experiments have demonstrated the defence reactions of the host tissues. The known histological changes in plant tissues and within the pathogenic developments connected with induced resistance were observed in qualitative and quantitative analysis in form of parameters e. g. hypersensitive reaction, autofluorescence, papilla formation and  $H_2O_2$ -locations. The employment of dyes which are able to stain living or dead cells, reviewed the hypothesis whether the inducing effect of *R. sachalinensis* is a kind of subliminal hypersensitive reaction. The possibility of having a direct effect on the germination and pathogenic development of *S. fuliginea* were studied with different pathotypes of powdery mildew and by pH-measurements of the leaf surface. Answering the question if there were more inducing or direct working ingredients of *R. sachalinensis* phenolic substances were established.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1 Pflanzenmaterial	10
2.2 Gewächshäuser / Klimakammern	10
2.3 Pathogene	11
2.3.1 <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	11
2.3.2 <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	11
2.4 Inokulation	11
2.4.1 <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	11
2.4.2 <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	12
2.5 Resistenzinduktoren	12
2.5.1 <i>Reynoutria sachalinensis</i> -Extrakt	12
2.5.2 Physcion	12
2.5.3 Benzothiadiazol	12
2.5.4 2,6-Dichlorisonicotinsäure	13
2.5.5 3,5-Dichlorsalicylsäure	13
2.6 Ausbringungsverfahren	13
2.6.1 Sprüh- und Gießapplikation	13
2.6.2 Infiltration	13
2.6.3 Injektion	14
2.7 Wirkungsgrad von Resistenzinduktoren	14
2.7.1 System Gurke / <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	15
2.7.2 System Gerste / <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	15
2.8 Nachweis von Sauerstoffradikalen	15
2.8.1 Quantitative Erfassung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung	15
2.8.2 Detektion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> über Fluoreszenz	16
2.8.3 Nachweis von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mittels Tissue-Printing	16
2.8.4 Histologischer Nachweis von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	17
2.8.5 Histologischer Nachweis von O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	17
2.9 Nachweis von Stickstoffradikalen	17
2.9.1 Probenaufarbeitung	18
2.9.2 Quantitative Bestimmung von NO	18
2.10 Einsatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -liefernden Substanzen	18
2.10.1 Externes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19
2.10.2 Proteinphosphatase-Inhibitor	19
2.10.3 Redoxaktiver Farbstoff	19
2.11 Einsatz von Radikalfängern	20
2.11.1 Ascorbinsäure	20
2.11.2 $\alpha$ -Tocopherol	20
2.11.3 Plantacur-E	20
2.12 Einsatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Inhibitoren	21
2.12.1 Proteinkinase-Inhibitor	21
2.12.2 Xanthinoxidase-Inhibitor	21
2.12.3 NADPH-Oxidase-Inhibitor	22

2.13 Proteinbestimmung	22
2.14 Aufarbeitung von Enzymen des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Metabolismus	22
2.14.1 Peroxidase	23
2.14.2 Catalase	23
2.14.3 Superoxiddismutase	23
2.14.4 Glutathionreduktase	23
2.14.5 Glutathion-S-transferase	23
2.14.6 Chalkonisomerase	23
2.15 Aufarbeitung von Enzymen außerhalb des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Metabolismus	24
2.15.1 API-ZYM	24
2.16 Aktivitätsmessung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -metabolisierenden Enzymen	24
2.16.1 Peroxidase	24
2.16.2 Catalase	25
2.16.3 Superoxiddismutase	25
2.16.4 Glutathionreduktase	26
2.16.5 Glutathion-S-transferase	26
2.16.6 Chalkonisomerase	27
2.17 Aktivitätsmessung von Enzymen außerhalb des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Metabolismus	28
2.17.1 API-ZYM	28
2.18 Elektrophorese	29
2.18.1 Proteinextraktion	29
2.18.2 Isoelektrische Fokussierung von Enzymen des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Metabolismus	29
2.18.2.1 Aktivitätsnachweis von Glutathionreduktase	30
2.18.2.2 Aktivitätsnachweis von Glutathion-S-transferase	31
2.19 Lokalisation von Enzymen außerhalb des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Metabolismus	32
2.19.1 Nachweis von Glucosidase-Aktivität	32
2.19.2 Nachweis von Galactosidase-Aktivität	33
2.20 Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	33
2.20.1 Färbung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	33
2.20.2 Präparation der Gerstenkoleoptilen	33
2.20.3 Vorbereitung der Gersten- und Gurkenprimärblätter	34
2.20.4 Anfärbung der Mehлтаupilze	34
2.20.4.1 Anfärbung der Pilzstrukturen mit Blue Ink	34
2.20.4.2 Anfärbung der Pilzstrukturen mit Lactophenol-Trypanblau	35
2.20.4.3 Anfärbung der Pilzstrukturen mit Coomassie Brilliant Blau	35
2.20.5 Mikroskopie und Auswertung der Koleoptilen und Primärblätter	35
2.21 Cytologische Untersuchungen	36
2.21.1 Nachweis von Zelltod	36
2.21.1.1 Färbung mit Trypan Blau und Evans Blau	36
2.21.1.2 Quantifizierung toter Zellen	36
2.21.2 Vitalfärbung	37
2.22 Beteiligung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe an der Induzierten Resistenz	37
2.22.1 Nachweis von phenolischen Verbindungen	37
2.23 Sonstige Einflüsse auf die Ausbildung der Induzierten Resistenz	38
2.23.1 Keimfähigkeit und Keimverzögerung von <i>S. fuliginea</i> -Sporen	38
2.23.2 Messungen des pH-Milieus auf Blattoberflächen	38
2.24 Statistische Auswertung	38

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1 Reaktionen der Wirtspflanzen auf den Einsatz von Induktoren	39
3.1.1 System <i>Cucumis sativus</i> / <i>Sphaerotheca fuliginea</i>	39
3.1.2 System <i>Hordeum vulgare</i> / <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	40
3.2 Beteiligung von O-Radikalen an der Induzierten Resistenz	41
3.2.1 Quantifizierung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen nach Induktorbehandlung	41
3.2.2 Lokalisation der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Bildung im Gewebe	43
3.2.2.1 Detektion mittels Tissue-Printing	43
3.2.2.2 Detektion mittels Diaminobenzidin	44
3.2.3 Lokalisation der O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Bildung im Gewebe	44
3.2.3.1 Detektion mittels Nitroblautetrazolium	44
3.3 Beteiligung von NO an der Induzierten Resistenz	45
3.4 Reaktionen der Wirtspflanze auf den Einsatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stimulanzen	47
3.4.1 Externes H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	47
3.4.2 Proteinphosphatase-Inhibitor	48
3.4.3 Redoxaktiver Farbstoff	49
3.5 Reaktionen der Wirtspflanze auf den Einsatz von Radikalfängern	50
3.5.1 Ascorbinsäure (Vitamin C)	50
3.5.2 α-Tocopherol (Vitamin E)	51
3.5.3 Plantacur-E	51
3.6 Reaktionen der Wirtspflanze auf den Einsatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Inhibitoren	52
3.6.1 Proteinkinase-Inhibitor	52
3.6.2 Xanthinoxidase-Inhibitor	53
3.6.3 NADPH-Oxidase-Inhibitor	53
3.7 Enzymaktivitäten	55
3.7.1 Enzymreaktionen in der Wirtspflanze nach Induktorbehandlung	55
3.7.1.1 Peroxidase	55
3.7.1.2 Catalase	56
3.7.1.3 Superoxiddismutase	56
3.7.1.4 Glutathionreduktase	57
3.7.1.5 Glutathion-S-transferase	58
3.7.1.6 Chalkonisomerase	58
3.7.2 Enzymreaktionen in der Wirtspflanze nach Induktorbehandlung und Pathogenbefall	59
3.7.2.1 Peroxidase	59
3.7.2.2 Catalase	60
3.7.2.3 Superoxiddismutase	61
3.7.2.4 Glutathionreduktase	62
3.7.2.5 Glutathion-S-transferase	63
3.7.2.6 Chalkonisomerase	64
3.7.3 Enzymreaktionen im API-ZYM-System	64
3.8 Isoelektrische Fokussierung von Enzymen nach Induktorbehandlung	66
3.8.1 Aktivitätsnachweise von Glutathionreduktase und Glutathion-S-transferase	66
3.9 Lokalisation von Enzymen im Gewebe nach Induktorbehandlung	66
3.9.1 Aktivitätsnachweise von Glucosidase und Galactosidase	66

3.10 Charakterisierung der Wirkung von Induktoren	67
3.10.1 Einfluß auf die Pilzentwicklung in Gurkengewebe	67
3.10.1.1 Bildung effektiver Papillen und Hypersensitiver Reaktionen	67
3.10.1.2 Pathogenbefall	68
3.10.1.3 Induktorprofile	68
3.10.2 Einfluß auf die Pilzentwicklung in Gerstenkoleoptilen	69
3.10.2.1 Keimrate und Bildung appressorialer Keimschläuche	70
3.10.2.2 Pathogenabwehr durch Bildung effektiver Papillen	70
3.10.2.3 Erfolgreiche Infektion	71
3.10.2.4 Infektionsstellen ohne sichtbare Zellantwort und ohne Haustoriumbildung	71
3.10.3 Einfluß auf die Pilzentwicklung in Gerstenprimärblättern	71
3.10.3.1 Direkte Wirkungen des <i>Reynoutria</i> -Extrakts	71
3.10.3.2 Pathogenabwehr durch Bildung effektiver Papillen	72
3.10.3.3 Pathogenabwehr durch Hypersensitive Reaktion	72
3.10.3.4 Pathogenbefall	72
3.10.3.5 Infektionsstellen ohne sichtbare Zellantwort und ohne Haustoriumbildung	73
3.10.4 Einfluß auf das Gurkenpflanzengewebe	73
3.10.4.1 Quantifizierung toter Zellen	73
3.10.4.2 Vitalität und Nekrotisierung von Zellen	74
3.10.5 Beteiligung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe an der Induzierten Resistenz	75
3.10.6 Sonstige Einflüsse auf die Ausbildung der Induzierten Resistenz	75
3.10.6.1 Keimfähigkeit u. Keimverzögerung von <i>S. fuliginea</i> -Sporen	75
3.10.6.2 Änderungen des pH-Milieus auf Blattoberflächen	77
<b>4 Diskussion</b>	<b>78</b>
4.1 Entstehung und Rolle des oxidativen Burst	78
4.2 Bedeutung von Radikalfängern und Proteinkinase-Inhibitor	80
4.3 Bedeutung von Inhibitoren der Xanthinoxidase u. NADPH-Oxidase	82
4.4 Bedeutung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produzenten	84
4.5 Beteiligung von NO an der Induzierten Resistenz	85
4.6 Enzymaktivitäten	87
4.7 Lokalisierte Nachweise von Angriff und Abwehr	90
4.8 Wirkungen auf die Konidienkeimung	94
4.9 Ausblick	98
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>123</b>
7.1 Bilderverzeichnis	123
7.2 Abkürzungsverzeichnis	127
7.3 Geräteliste	129

## 1 Einleitung

Das Ziel des Pflanzenschutzes ist nicht die Bekämpfung und Abtötung von Schadorganismen, sondern Ertragsverluste durch diese Schaderreger auf ein ökonomisch akzeptables Maß zu reduzieren. In der Praxis werden pflanzenbauliche Verfahren zur Vermeidung des Auftretens bzw. der Akkumulation von Schaderregern, die Resistenz der Pflanzen gegenüber Pathogenen und Schadtieren sowie Maßnahmen zur direkten oder indirekten biologischen und chemischen Bekämpfung genutzt. In dieser Arbeit wird sich schwerpunktmäßig mit dem Phänomen der Resistenz beschäftigt. Als Resistenz wird die Fähigkeit einer Pflanze bezeichnet, Befall und Besiedlung durch einen Schaderreger zu verhindern oder zu begrenzen. Dem gegenüber steht die Anfälligkeit. Beide sind zwar erblich bedingt, jedoch auch bei gleichbleibender genetischer Konstitution in bestimmtem Umfang veränderbar. Ob eine Pflanze mit einem Gen für Resistenz tatsächlich resistent ist, hängt auch direkt vom Erreger selbst ab (Hoffmann et al. 1994), d. h. Resistenz und Anfälligkeit sind nicht absolut, sondern immer in bezug auf einen bestimmten Erreger zu betrachten und meist abhängig von weiteren Parametern wie Altersstadium oder Umweltbedingungen. Die möglichen Abwehrreaktionen sind im Genom der Pflanze verankert und können unter bestimmten Bedingungen phänotypisch ausgeprägt werden. Bei Induzierter Resistenz müssen diese Resistenzfaktoren erst durch Induktoren stimuliert werden.

### Induzierte Resistenz

Induzierte Resistenz (IR) umfaßt mehrere unterschiedliche Arten von Widerstandsfähigkeit der Kulturpflanzen gegenüber unterschiedlichen Schaderregern und Schädlingen. Es werden z. Zt. drei voneinander unabhängige Wege diskutiert, die zur IR führen (van Loon 1998):

- I) Systemic Acquired Resistance (SAR) ist charakterisiert durch eine Abhängigkeit von der Akkumulation der Salicylsäure und PR-Proteinen. Als induzierende Faktoren werden Nekrosen (Zelltod) diskutiert.
- II) Induced Systemic Resistance (ISR) ist unabhängig von Salicylsäure und der Aktivierung von PR-Genen, aber statt dessen abhängig von Jasmonat und Ethylen. Sein Resistenzweg ist noch ungeklärt.
- III) Ein durch "wounding" induzierter jasmonat- und ethylenabhängiger Weg, der in der Induktion spezifischer Abwehrgene wie Proteinaseinhibitoren, Defensinen und Thioninen resultiert.

Es hat sich herauskristallisiert, daß eine ganze Reihe von chemischen Induktoren auf die gleiche Art und Weise in das Resistenzgeschehen der höheren Pflanzen eingreifen. Dabei handelt es sich um 2,6-Dichlorisonikotinsäure (DCINA), 3,5-Dichlorsalicylsäure (DCSA) und Benzothiadiazol (Bion). Alle genannten chemischen Verbindungen simulieren die natürlich vorkommende SA. Vermutlich greifen diese Substanzen am selben Punkt wie SA selbst oder *downstream* vom SA-Target ein. Diese Moleküle sind unabhängig von einer Akkumulation der SA. Bewiesen ist dieses Merkmal durch den Einsatz der sogenannten NahG-Pflanzen, in denen die Induktoren trotz SA-Defektmutation aktiv sind.  $\beta$ -Aminobuttersäure (BABA) greift



hingegen *upstream* von SA in das Geschehen ein, so daß sie von einer SA-Anhäufung abhängig und nicht in NahG-Pflanzen aktiv ist. Der Einsatz von Pathogenen mit nekrotisierender Wirkung (Zelltod) konnte die Wirkung von BABA simulieren, so daß die gesamte Wirkungskette von BABA bis hin zur Expression von Abwehrgenen beschrieben ist. Die zweite Gruppe von Induktoren beinhaltet einzelne Pflanzeninhaltsstoffe (SA und Jasmonsäure), die vorwiegend in dikotylen Pflanzen effektiv sind und letzt genannter wahrscheinlich bei der Ausprägung der IR gegen Insekten beteiligt ist. Eine dritte Gruppe von Induktoren stellen die Pflanzenextrakte (*Reynoutria sachalinensis*, *Hedera*- und *Viscum*-Extrakt) und Kulturfiltrate von Bakterien und Pilzen (*Bacillus subtilis* (B50)- Präparat) dar. Bei den möglichen Agentien und Mechanismen der Resistenzinduktion handelt es sich um folgende: a) Lignifizierung, b) Papillenbildung, c) Bildung phenolischer Substanzen, d) Hypersensitivitätsreaktion, e) PR-Proteine (pathogenesis-related protein), f) Lipoxygenase und g) aktive Sauerstoffspezies. Daran anschließend ergeben sich nach den neuesten Forschungsergebnissen folgende Zusätze:

Die Papillenbildung wird von einem in der Plasmamembran lokalisierten Enzym, der Callosesynthase, die insbesondere durch Calcium und Zellwandbruchstücke nach Verwundung direkt aktiviert werden soll, sehr stark beeinflusst. Als wesentliches Element der Bildung effektiver, nicht penetrierter Papillen konnte die sogenannte "cross-linking"-Reaktion identifiziert werden. Diese ist eine von  $H_2O_2$  getriebene, ungerichtete Vernetzung von freien Zellwandpolymeren und niedermolekularen Stoffen, insbesondere Phenolen. Sie bilden unter der Stelle im Gewebe, wo der Pilz einzudringen versucht, ein dichtes Netz, welches als physikalische Barriere fungiert. Die Hypersensitive Reaktion weist wesentliche Eigenschaften des programmierten Zelltods (PCD) auf. Vermutlich stellt die HR eine pflanzliche Form der Apoptose dar, d. h. ein aktiv gesteuertes transkriptions- und energieabhängiges Absterben der attackierten Zellen. Der programmierte Zelltod beginnt mit starker Cytoplasmaströmung. Im folgenden wird die DNS prozessiert und das Chromatin kondensiert. Das Cytosol kollabiert und schrumpft unter Beibehaltung der Zellorganellen. Wichtige und frühe Ereignisse in der Hypersensitiven Reaktion sind der oxidative Burst und der rapide Ionenfluß am Plasmalemma, der durch eine  $Ca^{2+}$ -Aufnahme und einen ATPase getriebenen  $Cl^-$ - und  $K^+$ -Efflux charakterisiert ist. Die chemischen Induktoren bewirken eine quantitative Erhöhung der Abwehrreaktion. Obwohl sie im Rahmen der induzierten Resistenzmechanismen eine entscheidende Rolle einnimmt, findet sie sich nicht in allen Pathosystemen wieder. Die Auslöser der Hypersensitiven Reaktion sind noch nicht in allen Fällen geklärt. Einige Komponenten der Pathogenabwehr, wie reaktive Sauerstoffspezies und Phytoalexine, können durch Zellmembranschädigung toxisch wirken und damit PCD auslösen. Auch Serin- und Cystein-Proteinasen sowie Endonukleasen spielen als Auslöser der HR eine Rolle. Dennoch sind dies zur Pathogenabwehr induzierten Moleküle nicht die Determinanten für die HR. Außer dem Zelltod kann auch eine Syntheseaktivierung von Phytoalexinen und PR-Proteinen eintreten. Zudem existieren gegen Zelltod schützende Mechanismen in Form von oxidierenden Enzymen, deren Synthese ebenfalls durch den oxidativen Burst aktiviert werden kann (Morel & Dangl 1997). Zellen, die eine HR unterlaufen, geben Signale in Form von diffundierendem SA und  $H_2O_2$  an benachbarte Zellen weiter, die Abwehrmechanismen

auslösen (Levine et al. 1994; Neuenschwander et al. 1995). Es ist bekannt, daß die Ausbildung der induzierten Resistenz von der Akkumulation sogenannter PR-Proteine begleitet wird. Zur Zeit wird davon ausgegangen, daß alle Salicylsäure-ähnlichen Induktoren eine PR-Genexpression induzieren können. Ob ein PR-Protein kausal am Resistenzmechanismus beteiligt ist, muß für jeden Erreger überprüft werden. In manchen Fällen konnte nachgewiesen werden, daß eine Störung der PR-Genexpression auch eine gestörte Resistenz zur Folge hatte. Die Kriterien für eine Beteiligung eines gegebenen PR-Proteins am Mechanismus der IR sind: a) die zeitliche und räumliche Korrelation zwischen Akkumulation des Proteins und Resistenz, b) die Abwesenheit des Proteins in "loss of function"-Mutanten und c) eine antimikrobielle Aktivität des Proteins gegenüber dem zu betrachtenden Schaderreger *in vitro* oder *in vivo*. Das Auftreten eines oxidativen Bursts im Rahmen der IR begründet die Frage, ob die reaktiven Sauerstoffspezies als Komponenten von Signalketten oder als Substrate in Resistenzreaktionen fungieren. Für das dikotyle System konnte bestätigt werden, daß  $H_2O_2$  über den Weg einer  $O_2^-$ -bildenden NADPH-Oxidase akkumuliert wurde, wohingegen bei monokotylen Pflanzen dies nicht nachvollzogen werden konnte. Hier könnten eventuell epidermislokalisierte Oxalatoxidasen oder Peroxidasen greifen.

### **Das antioxidative Verteidigungssystem der Pflanzen**

Das antioxidative Verteidigungssystem (ARS) besteht aus über Enzyme wirkende und nicht-enzymatisch reagierende Antioxidantien, die in einem Netzwerk von Reaktionen zusammenarbeiten, um die Funktionen des ARS zu erfüllen. Nach Smirnoff (1993) lassen sich die Elemente des ARS auch in Komponenten gliedern, die einerseits direkt mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren und so die ROS-Konzentration in der Pflanze niedrig halten z. B. Superoxiddismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbatperoxidase (APOX), Ascorbat und Vitamin E, und andererseits solche, die Antioxidantien regenerieren z. B. Glutathionreduktase (GR), Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat<sub>red.</sub> (NADPH) und Glutathion. Antioxidantien sind Substanzen, die, wenn sie selbst schnell wieder regeneriert werden, schon in sehr geringen Konzentrationen die Oxidation eines Substrats verzögern oder verhindern können (Halliwell 1994). Sie sind weiterhin in der Lage, ROS unschädlich zu machen, ohne dabei in ein destruktives Radikal umgebaut zu werden (Noctor & Foyer 1998). Die antioxidative Strategie von Zellen ist darauf ausgerichtet, potentiell toxische Sauerstoffspezies oder deren Derivate auf verschiedenen Stufen ihrer Entstehung oder ihrer Reaktionen mit Biomolekülen zu hemmen oder zu blockieren. Grundsätzlich gibt es innerhalb dieser Strategie vier verschiedene Mechanismen:

- I) Kleine Moleküle, die als Radikalfänger (Scavenger, Quencher aktivierter Zustände) fungieren (Bohnert & Jensen 1996);
- II) Enzyme, die mit bestimmten aktivierten Sauerstoffspezies reagieren und diese in weniger toxische Verbindungen überführen oder eine Reaktion zwischen ROS und einem Antioxidans katalysieren (Redoxreaktion);
- III) Elektronentransportketten, die Scavenger oder Quencher reaktivieren;

- IV) Reparatursysteme, die nach bereits vollzogenem Schaden diesen reorganisieren und geschädigte Moleküle aus dem Metabolismus entfernen.

Slater et al. (1988) geben als wichtige Kriterien für eine effektive Schutzwirkung von Radikalfängern und antioxidativen Systemen folgende Punkte an:

- a) Der Radikalfänger muß seinen Wirkort bzw. das betreffende zelluläre Kompartiment, in dem freie Radikale produziert werden, permeieren können.
- b) Der Radikalfänger muß zur richtigen Zeit an der richtigen Stelle sein, denn die Halbwertszeiten reaktiver Sauerstoffspezies sind relativ kurz.
- c) Das Radikalfängersystem bzw. die Antioxidantien müssen eine hohe Affinität zum freien Radikal aufweisen, um mit der Schädigung in Konkurrenz treten zu können.
- d) Der Scavenger muß zur richtigen Zeit am richtigen Ort eine geeignete Konzentration erreichen, um einen Großteil der schädigenden Radikale abfangen zu können.

#### Ascorbinsäure:

Ascorbinsäure kann in drei Redoxstufen vorliegen (reduzierte Ascorbinsäure, Semidehydroascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure) und erfüllt seine natürliche Aufgabe im wasserlöslichen, plasmatischen Raum. Sie fungiert entweder als Antioxidans oder Prooxidans. Ihr Salz (Ascorbat) ist das wichtigste Reduktionsmittel bei der Beseitigung von  $H_2O_2$  in Pflanzen (Mehlhorn et al. 1996). Es beseitigt jedoch auch direkt alle ROS, d. h. es reagiert mit Hydroxyl-Radikalen, Superoxidanionen oder Singulett-Sauerstoff (Buettner & Jurkiewicz 1996; Halliwell 1974), und nimmt teil an der Regeneration des hydrophilen Vitamin E (Reduktion der oxidierten Vitaminform; Padh 1990), das als lipophiles Antioxidans oxidativ geschädigte Membranlipide (Alkylperoxyradikale) zu den entsprechenden Alkoholen reduziert (Alscher et al. 1997).

#### $\alpha$ -Tocopherol:

Das  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) ist ein Radikalfänger, dessen Wirkung im wesentlichen auf lipophile Membranbereiche beschränkt ist. Es durchläuft ähnlich wie das Vitamin C drei Redoxstufen, wobei reduzierte Form, Semidehydroform und oxidierte Form auftreten können (Hicks & Gebicki 1981). Oxidiertes Vitamin E wird vermutlich an hydrophilen Membranaußenseiten durch Vitamin C (Ascorbat-Glutathion-Zyklus, Baker & Orlandi 1995) wieder reduziert, wobei seine Radikalscavenger-Eigenschaften in der Membran reaktiviert werden. Tocopherole sind bekannte Reaktionspartner für Singulett-Sauerstoff. Neely et al. (1988) zeigten, daß die Tocopherolreihe  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol in abnehmender Sequenz mit Singulett-Sauerstoff reagiert. Cadenas et al. (1989) wiesen darauf hin, daß es entweder als Antioxidans oder Prooxidans fungieren kann.

#### Wechselwirkung:

Da die Schutzwirkung zahlreicher Antioxidantien über Ein-Elektronentransportschritte zustande kommt, resultieren aus diesen Reaktionen wieder freie Radikale. Da freie Radikale häufig mit relativ hohen Reaktionsgeschwindigkeiten miteinander reagieren, tun dies auch

Vitaminradikale und disproportionieren dabei. Derart reagieren auch Vitamin E und Vitamin C über ihre freien Radikale direkt miteinander. Ascorbinsäure allein stellt kein Antioxidans für hydrophobe, zelluläre Bereiche dar, sondern nur in Kooperation mit Vitamin E. In ähnlicher Weise, wie das Vitamin E durch die Ascorbinsäure regeneriert wird, wird Vitamin C durch Glutathion wiederhergestellt. Ein optimaler Oxidationsschutz ist nur gewährleistet, wenn das Verhältnis von Vitamin C zu Vitamin E hoch ist. Dann kann eine streßabhängige Lipidperoxidation wirkungsvoll verzögert oder blockiert werden.

## ROS-Metabolismus

Pflanzenzellen produzieren aktiven Sauerstoff während der Interaktion mit potentiellen Pathogenen. Aktive Sauerstoffspezies, darin eingeschlossen Superoxidanion, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale, können viele zelluläre Abläufe, die mit der Wirt-Pathogen-Beziehung involviert sind, stark beeinflussen. Die Stoffgruppe kann aufgrund ihrer Kurzlebigkeit und ihrer Verbindung zu antioxidativen Mechanismen wie SOD, Peroxidase (POX), Ascorbat-Glutathion-Zyklus und CAT nur schwer erfaßt werden. Es existieren zwei Modelle, die als Quelle von ROS beim oxidativen Burst in Frage kommen: a) das NADPH-Oxidase-System und b) die pH-abhängige Bildung von  $H_2O_2$  durch extrazelluläre Peroxidasen (Bolwell & Wojtaszek 1997; Stich & Ebermann 1984), jedoch ist noch nicht geklärt, welcher Mechanismus während einer Wirt-Pathogen-Interaktion vorherrscht. In vielen Systemen kann eine Steigerung der ROS-Gehalte innerhalb von Sekunden bis Minuten nach einer Behandlung mit einem Elicitor oder einem Pathogen detektiert werden, wobei in der Regel der oxidative Burst eher die Aktivierung von schon vorhandenen Oxidase-Komponenten beinhaltet als eine *de novo*-Synthese von Enzymen des oxidativen-Burst-Mechanismus. Die Höhe und der zeitliche Verlauf des Bursts variieren in den verschiedenen Systemen stark. Häufig wird eine Akkumulation von  $H_2O_2$  als ein lokaler Schwellenauslöser für den Zelltod und als ein Verbreitungssignal für die Induktion von antioxidativen Schutzsystemen angesehen (Alvarez & Lamb 1997). Der Burst kann zeitlich zwischen den frühen Ereignissen wie der Stimulation des Ionenstroms durch die Plasmamembran und der späteren Änderung bei der Genexpression eingeordnet werden. Von ROS, die als Antwort auf ein Pathogen oder einen Elicitor produziert werden, wird vermutet, daß sie eine direkte antimikrobielle Wirkung haben und eine Rolle bei anderen Verteidigungsmechanismen spielen, z. B. Ligninproduktion (Olson & Varner 1993), Lipidperoxidation, Phytoalexinbildung, oxidatives cross-linking von Zellwand-Polymeren (Bradley et al. 1992), Ethylenbildung (Dixon & Lamb 1990) und Hypersensitive Reaktion (Alvarez & Lamb 1997, Wojtaszek 1997). Ein oxidativer Burst kann seinen Ursprung auch in abiotischem Streß, wie z. B. UV-Strahlung, Hitze, Kälte, Dehydration und Ozon haben (Doke 1997; Foyer & Halliwell 1997; Smirnov 1998; Vallélian-Bindeschedler et al. 1998).  $H_2O_2$  wird demzufolge aus den unterschiedlichsten Gründen von einem biologischen System, wie z. B. Pflanzen oder Zellkulturen, produziert, aber nur in wenigen Fällen wird eine Schwellenkonzentration erreicht oder es reagiert mit anderen Molekülen synergistisch, wie z. B. NO oder Salicylsäure (SA), so daß es die ihm zugeteilte Wirkung erreicht (Dangl 1998).

### Molekularer Sauerstoff:

O<sub>2</sub>, selbst relativ inert und nicht toxisch, wird für biologische Systeme bedrohlich, wenn sich seine Elektronenstruktur ändert. Die erste Reduktion durch Elektronen, aus der ein Superoxidradikal (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) resultiert, benötigt einen geringen Input an Energie, welche von NAD(P)H geliefert wird. Weitere Reduktionen von O<sub>2</sub><sup>-</sup> ohne zusätzlichen Energieaufwand liefern Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxylradikale (OH•) und Wasser (H<sub>2</sub>O).

### Wasserstoffperoxid:

In Pflanzen kann es bei Pathogenbefall, Verwundung, Streß oder bei Applikation von avirulenten Elicitoren zu einem raschen Anstieg von ROS kommen. Darunter fallen Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale. Diese rasche und enorme Bildung von Sauerstoffspezies, der sogenannte "oxidative Burst", wurde sowohl in Mono- als auch in Dikotyledonen beobachtet. Die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat dabei den größten Anteil; dieses Radikal ist involviert in den Reaktionen zwischen Wirt und Pathogen (Sutherland 1991; Levine et al. 1994; Mehdy 1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann aus O<sub>2</sub><sup>-</sup> durch Disproportionierung mit Hilfe von SOD entstehen oder durch Anwesenheit von POX generiert werden (Hückelhoven et al. 1999). Es tritt lokal bei der effektiven Papillenbildung und der Ausbildung einer HR auf. Die Frage nach dem Mechanismus der Funktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist noch offen. Es könnte bei Signaltransduktionen zum einen selbst das Signalmolekül sein, da es sehr unterschiedliche Reaktionen im pflanzlichen Gewebe auslösen kann (Langen et al. 1998), zum anderen könnte es nur eine Substanz von vielen in der Reaktionskette der induzierenden Wirkung darstellen. Die Beteiligung generell scheint aber aufgrund der Nachweisbarkeit zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Induktion sicher zu sein. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat in den verschiedensten Wirt-Pathogen-Systemen die unterschiedlichsten Aufgaben übernommen. Bei Verwundungen bewirkt es eine Zellwandverstärkung durch eine schnelle Quervernetzung hydroxyprolinreicher Glycoproteine (Thordal-Christensen 1997) und durch Lignifizierung, wobei es als Elektronenakzeptor bei der Polymerisation dient (Olson & Varner 1993). Das bei dieser Eiweißvernetzung rasch gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellt den oxidativen Burst der Wundreaktion dar. Nach Lamb & Dixon (1997) und Levine et al. (1994) spielt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der Auslösung einer HR eine entscheidende Rolle, wobei es zur Entstehung des programmierten Zelltods einer hohen Konzentration bedarf. Jedoch nicht in allen Systemen ist das Auftreten einer Hypersensitiven Reaktion gekoppelt an eine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (Baker & Orlandi 1995). Sutherland (1991) zeigte, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch als stark wirkendes Oxidans eine direkte antimikrobielle Wirkung auf den Erreger haben kann. Ein weiterer Aspekt ist, daß diffundierendes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Transkription von Genen aktivieren soll, deren Enzyme die Zellen vor oxidativen Schäden schützen (Levine et al. 1994). Es kann auch davon ausgegangen werden, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Phytoalexinbildung anregt oder sogar induziert.

### Superoxidanion:

Das Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ist in Epidermiszellen nach Zellwandpenetration und Kontakt des Erregers mit dem Plasmalemma der Pflanze und im Mesophyll unter Epidermiszellen, die eine HR unterlaufen, zu finden. Es wird gebildet durch eine im Plasmalemma lokalisierte

NADPH-Oxidase (Mehdy 1994; Baker & Orlandi 1995; Lamb & Dixon 1997). Reaktive Sauerstoffspezies können in verschiedenen Kompartimenten der Zelle entstehen. Bei nicht photosynthetischen Geweben sind als solche Kompartimente das Cytosol, die Mitochondrien, das endoplasmatische Reticulum sowie die Peroxisomen zu nennen. Bei photosynthetisch aktiven Organismen treten besonders die Chloroplasten als sauerstoff-aktivierende Kompartimente hervor. Unabhängig vom Entstehungsort entsprechender Sauerstoffradikale oder aktivierter Sauerstoffspezies kooperieren bei deren Metabolismus eine Vielzahl kleiner antioxidativer Moleküle mit Entgiftungsenzymen. Zu den intrazellulären antioxidativen Schutzenzymen gehören SOD, CAT, Glutathionperoxidase (GPOX), Glutathion-S-transferase (GT) und verwandte GSH(Glutathion<sub>red.</sub>)-abhängige Enzymsysteme. Da Superoxidanionen nicht membrangängig sind, müssen Teile des ARS in verschiedenen Kompartimenten der Zelle vorliegen. Welcher Weg zur Beseitigung dieses Radikals von der Zelle eingeschlagen wird, ist höchstwahrscheinlich von der gebildeten Menge abhängig. Das entstehende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann aber in den Pflanzen grundsätzlich nur von zwei Enzymen beseitigt werden: CAT und POX. Catalasen kommen jedoch nicht in Chloroplasten höherer Pflanzen vor und sind in Mitochondrien und im Cytosol wenig aktiv. Hohe Aktivitäten wurden nur in der Microbody-Matrix gefunden, da diese diffusionskontrolliert arbeitet und daher eher geeignet ist, an Orten großer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion diese zu beseitigen. POX hingegen hat aufgrund seiner hohen Affinität zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Michaelis-Konstante K<sub>M</sub> 1 µM) im Gegensatz zu CAT (K<sub>M</sub> 1,1 mM) seinen Wirkort dort, wo kontinuierlich kleine Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gebildet werden (Mizuno et al. 1998).

### Stickoxid

Eine weitere chemische Verbindung, das Stickoxid (NO), wurde neuerdings in Zusammenhang gebracht mit den Reaktionen der reaktiven Sauerstoffspezies. NO wurden in der Pflanzenpathologie drei Aufgabenbereiche zugewiesen (Thomsen et al. 1998): I) intrazelluläres Signal, II) transzellulärer Botenstoff und III) Zellgift. Es handelt sich bei NO um ein endogenes, freies Radikal (Hajri et al. 1998), welches als Signaltransduktionsmolekül in eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen einbezogen ist (Moncada et al. 1991). Als reduzierendes wie oxidierendes Agens ist es fähig, sowohl als Elektronendonator als auch als -akzeptor zu fungieren (Beckman et al. 1990). Es reagiert als Radikal mit Sauerstoffspezies und Wasser zu gewebeschädigenden N-Oxiden, wie z. B. Peroxynitrit (Esumi & Tannenbaum 1994; Dangl 1998; Beckman et al. 1990), wobei der Ablauf dieser Reaktion eine Frage der NO-Konzentration ist (Feelisch 1998). Die Produktion von NO ist nicht auf Organismen begrenzt, die Stickoxidsynthase (NOS) besitzen. Vielmehr ist die Nitrareduktase von Bakterien, Pilzen und Pflanzen als alternartive Quelle bekannt (Hausladen & Stamler 1998). NO kann auch ein Nebenprodukt der Denitrifikation oder der Respiration sein. Pflanzen können NO auch noch durch die Produktion durch Bodenorganismen ausgesetzt sein. Generell kann man davon ausgehen, daß die Wege zur Bildung von NO sowohl enzymatischen als auch nicht-enzymatischen Charakter haben und zwischen den Verbindungsklassen stark variieren. Allgemein wird es mit Apoptose und Nekrosenbildung in Verbindung

gebracht, hat aber sowohl cytotoxische als auch cytoprotektive Eigenschaften (Okuno et al. 1998). Nathan & Shiloh (2000) unterstützten diese Aussage, indem sie sowohl von nicht-toxischer (Signalwirkung) als auch von toxischer NO-Wirkung ausgehen. Letztere wird nutzbar gemacht für die Verteidigung der Wirtspflanze, indem NO den programmierten Zelltod verstärken kann (Delledonne et al. 1998; Durner et al. 1998). Sparrman et al. (1959) berichteten, daß NO als Scavenger für freie Radikale fungiert und Pflanzen vor UV-Strahlung schützen kann. Desweiteren hat NO in biologischen Systemen eine direkte oder indirekte antioxidative Wirkung. Auftretende Gewebeschädigungen durch oxidativen Streß zeigten, daß NO diese hemmt sowohl auf molekularer als auch auf funktionaler Ebene durch Abschwächung der Prozesse von Sauerstoffradikalen bzw. durch Reduzierung der Bildungsrate dieser Verbindungen (Radi et al. 1995). Saran & Bors (1994) zeigten, daß NO in Hinblick auf die Keimung als intrazellulärer, weitläufiger Botenstoff fungiert, weil Stickoxid im Gegensatz zum Superoxidanion eine längere Halbwertszeit hat ( $> 1$  s), diffusionsfähig ist und eine niedrige Dimerbildungsrate besitzt.

### **Ziele der vorliegenden Dissertation**

In der vorliegenden Dissertation sollten wichtige Glieder der Signaltransduktionskette des Resistenzinduktors *Reynoutria sachalinensis* (R. s.) und dessen Inhaltsstoff Physcion mit denen systemischer Induktoren (DCINA, Bion, DCSA) verglichen werden. Dabei wurden Untersuchungen in den Systemen Gurke und Gerste vergleichend durchgeführt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Signalkette von monokotylen und dikotylen Pflanzen zu analysieren. Der Arbeitsschwerpunkt wurde auf die Bedeutung der mit dem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Haushalt in Verbindung stehenden Enzyme in der Signalkette zur Resistenzinduktion von *Reynoutria sachalinensis* und Physcion im System Gurke / *Sphaerotheca fuliginea* gelegt. Dafür wurden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -aufbauende wie -abbauende und an den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stoffwechsel anknüpfende Enzyme betrachtet und ihre Aktivität miteinander verglichen. Desweiteren wurde versucht, die Beteiligung anderer Enzymgruppen außerhalb des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stoffwechsels nachzuweisen. Verwendet wurde dafür das API-ZYM-System. Die dabei erfaßten Enzyme wurden z. T. in Tissue-Printing-Verfahren qualitativ nachgewiesen, oder ansatzweise von ausgewählten Enzymen deren Formen mittels isoelektrischer Fokussierung detektiert. Die strukturellen und biochemischen Arbeiten zur Untersuchung der Abwehrreaktionen der Wirtspflanzen wurden in den Systemen Gerste / *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* und Gurke / *Sphaerotheca fuliginea* durchgeführt. Die in Verbindung mit der Induzierten Resistenz bekannten histologischen Veränderungen im Pflanzengewebe und innerhalb der Pathogenentwicklung wurden in Form von einzelnen Parametern wie Hypersensitive Reaktion, Autofluoreszenz, Papillenbildung,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildungsorte etc. quantitativ und qualitativ festgehalten. Weiterhin wurden Untersuchungen vorgenommen, die die Hypothese prüfen sollten, ob es sich bei der induzierenden Wirkung von *R. sachalinensis*-Extrakt um eine HR handelt. Dafür kamen Farbstoffe zum Einsatz, die lebendes und totes Gewebe sichtbar machten, wobei abgestorbene Zellverbände auch unterstützend photometrisch nachgewiesen wurden. Ein weiteres wichtiges Radikal, das NO, wurde in die Untersuchungen mit

einbezogen. Dieses kann mit Elementen des aktivierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stoffwechsels reagieren und zur Abschwächung des Krankheitsverlaufs führen. Erneut wurde auch die Frage der direkten Wirkung von *R. sachalinensis*-Extrakt auf den Infektionsverlauf von Mehltau untersucht. Dazu wurden Keimfähigkeitstests mit unterschiedlichen Pathotypen von Gurkenmehltau und Messungen des pH-Wertes im Blattoberflächenmilieu durchgeführt. Die Frage nach weiteren induzierenden oder direkt wirkenden Inhaltsstoffen von *R. sachalinensis* wurde durch den Einsatz eines Farbstoffes als Reagenz für phenolische Verbindungen geklärt.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Pflanzenmaterial

Für das Wirt-Pathogen-System Gurke / Echter Gurkenmehltau wurden Gurkenpflanzen (*Cucumis sativus*) der Sorte "Chinesische Schlange" verwendet. Im System Gerste / Echter Gerstenmehltau wurden die Sorten in Anlehnung an die Versuchsfrage ausgewählt. Biotests zum Wirkungsgrad wurden z. T. mit der suszeptiblen Wintergerstensorte "Igri" vorgenommen, welche über das Resistenzgen Mlra verfügt. Die meisten Mehлтаupathotypen in Europa besitzen jedoch schon eine Mlra-Virulenz. Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zur Induzierten Resistenz und Wasserstoffperoxidbildung wurden an der anfälligen Sommergerstensorte "Pallas" durchgeführt. Das Saatgut wurde von Frau Dr. K. Flath (BBA Kleinmachnow, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland) und Frau Prof. L. Munk (Royal Veterinary and Agricultural University of Denmark, Department of Plant Biology) bereitgestellt. Diese Sorte besitzt das Resistenzgen Mla8 (Jensen et al. 1992) und ist für alle gängigen Mehltaurassen anfällig. In oder um den Mla-Locus auf Chromosom 5 liegen zwanzig eng gekoppelte Resistenzgene. Das Wirkungsprinzip des Mla-Gens beruht auf einer Eindringungsresistenz, d. h. es beeinflusst die Häufigkeit der Penetration des Erregers in das pflanzliche Gewebe.

Die Anzucht der Gurkenpflanzen erfolgte in zwei Arbeitsschritten. Der Samen wurde dazu zuerst in Fruhstorfer Erde Typ P ausgesät. Nach ca. sieben Tagen wurden die Jungpflanzen in Töpfe (Größe 10), gefüllt mit einem Gemisch aus Sand und Fruhstorfer Erde Typ T (Verhältnis 1:3), umgesetzt und bis zum Zweiblattstadium in einem klimatisierten Raum angezogen. Dieser wurde zur Vermeidung einer Kontamination des gesunden Pflanzmaterials ausnahmslos nur für diesen Zweck genutzt. Das Gerstensaatgut wurde zwei bis drei Tage in einer feuchten Kammer bei Dunkelheit und Umgebungstemperatur vorgekeimt. Anschließend wurden jeweils 5 Keimlinge in einen 200 ml Topf in Reihe platziert, der mit standardisierter Einheitserde (LD 80) gefüllt war. Die weiteren Angaben zum Alter der Gerstenpflanzen beziehen sich auf die Anzahl der Tage nach Aussaat.

### 2.2 Gewächshäuser / Klimakammern

Die optimalen abiotischen Bedingungen zur Anzucht der Jungpflanzen, Aufrechterhaltung des Versuchspflanzenbestandes und der obligat biotrophen Pathogene werden von nachstehenden Parametern beschrieben. Die Messungen der relativen Luftfeuchte und der Temperatur erfolgten mit einem Thermohygrographen, die Lichtintensität wurde mit einem Luxmeter (Typ Elvos LM 1010) gemessen.

#### Anzucht:

Dauer der Belichtungsphase 16 h  
Lichtintensität 23000-25000 lx  
relative Luftfeuchtigkeit 75 %  
Temperatur 20-25 °C

#### Gewächshaus:

Dauer der Belichtungsphase 16 h  
Lichtintensität 2500-3000 lx  
relative Luftfeuchtigkeit 40-60 %  
Temperatur 14-18 °C

## 2.3 Pathogene

### 2.3.1 *Sphaerotheca fuliginea*

Der vorwiegend verwendete Pathotyp des Echten Mehltaus an Gurke, *Sphaerotheca fuliginea*, konnte freundlicherweise von der AG Dr. Schmitt (Biologische Bundesanstalt Darmstadt, Institut für biologischen Pflanzenschutz) und der BASF (Limburgerhof) übernommen werden. Zwecks vergleichender Untersuchungen wurde ein weiterer Pathotyp des gleichen Pilzes eingesetzt. Dieser stammte aus der Mehltauzucht der AG Dr. Konstantinidou-Doltsinis (Patras, Griechenland). Die beiden Pathotypen unterschieden sich in ihrem physiologischen Verhalten in geringem Maße. Diese wurden auf Gurkenpflanzen vermehrt und die infizierten Pflanzen bis zur Verwendung im Gewächshaus kultiviert. Die Mehltauzuchten wurden dabei räumlich getrennt voneinander aufbewahrt zur Vermeidung einer Vermischung beider Pathotypen.

### 2.3.2 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Die Untersuchungen an Gerste wurden mit dem Erreger des Echten Gerstenmehltaus (*Blumeria* [alt: *Erysiphe*] *graminis* f. sp. *hordei*) durchgeführt. Dieser phytopathogene Pilz wurde freundlicherweise von der AG Prof. Kogel (IPAZ, Universität Gießen) und der AG Prof. Sikora (Universität Bonn, Institut für Pflanzenkrankheiten) zur Verfügung gestellt. Das Pathogen beinhaltete eine Mischung aus verschiedenen Pathotypen, das Isolat K1 und A6. Die Anzucht und Vermehrung erfolgte auf der suszeptiblen Gerstensorte "Igri". Dazu wurden ca. sieben Tage alte Gerstenpflanzen mittels Trockeninokulation infiziert. Weitere sieben Tage später sporulierte der Pilz und wurde für Versuche ca. ein bis zwei Wochen lang genutzt.

## 2.4 Inokulation

### 2.4.1 *Sphaerotheca fuliginea*

Das Ausbringen des Pathogens auf die Gurkenblätter erfolgte je nach Biotest-Verfahren als Trocken- oder Naßinokulation. In beiden Fällen wurden 24 h vor der Inokulation infizierte Gurkenblätter vorsichtig abgeschüttelt, um für die Inokulation junge Konidien zu erhalten. Bei einer Naßinokulation wurden die mit frischen Sporen besetzten Gurkenblätter in eine Netzmittelsuspension (0,0125 % Tween 80 (v/v)) eingetaucht und abgeschwemmt. Die Einstellung der Konidiendichte erfolgte mittels einer Bakterien-Zählkammer (Typ Thoma) oder durch eine photometrische Messung der Trübung bei 590 nm. Die Sporenkonzentration lag im Durchschnitt bei  $5 \times 10^4$ - $10^5$  Konidien/ml Suspension. Die Inokulation geschah mit einem unter Vakuum stehenden Laborsprüher bis zum Erreichen eines tropfnassen Zustandes der Blattoberfläche. Zur Durchführung der Trockeninokulation wurden lediglich mit Mehltau befallene Blätter aus der Stammzucht über den zu inokulierenden Versuchspflanzen abgeblasen. Dabei wurden stets gleich stark befallene Blätter verwendet.

#### **2.4.2 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei***

Der Echte Gerstenmehltau wurde nur durch Trockeninokulation auf die Versuchspflanzen ausgebracht. Einen Tag vor der Neuinfektion gesunder Pflanzen wurden infizierte Pflanzen der Mehltau-Stammzucht leicht abgeschüttelt zwecks Bildung neuer, gleichaltriger Sporen (Hirata & Togashi 1957). In einem Zeitraum von 24 h wurden dann neue Konidien durch Abschnürung von den Konidienträgern gebildet. Die Inokulation selbst erfolgte in einem dafür angefertigten Inokulationsturm (Moch 2000), welcher den Vorteil einer sauberen und gleichmäßigen Berieselung der zu infizierenden Pflanzen hatte. Die Inokulationsdichte wurde mittels eines speziell gerasterten Objektträgers bestimmt, der im gleichen Arbeitsschritt mitinokuliert wurde.

### **2.5 Resistenzinduktoren**

#### **2.5.1 *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt**

Das Blattmaterial zur Herstellung des wässrigen Extrakts wurde von Mitte August bis Anfang September 1997 auf einer landwirtschaftlich genutzten Fläche der BASF (Agrarzentrum Limburgerhof) manuell geerntet. Nach einer viertägigen Trocknung bei 54 °C hatte das Erntegut einen Trockensubstanzgehalt (TS) von 21-30 %. Die Blätter wurden anschließend zu einem sehr feinen Pulver (Siebgröße 4 mm, 15 U/min) vermahlen (Mühle Fa. Retsch) und bis zur Verwendung im Dunkeln bei Zimmertemperatur gelagert. Zur Herstellung eines 1 % wässrigen Extrakts wurden 1 g vermahlenes Blattmaterial 10 min mit 4 ml Aceton versetzt zwecks Vorextraktion und anschließend mit auf 50 °C erwärmtem 0,0125 % Tween 80 auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt und 1 h unter Rühren extrahiert. Mit einer Nutsche wurde unter Vakuum abfiltriert und der Extrakt sofort verwendet.

#### **2.5.2 Physcion**

Physcion ist bis zu diesem Zeitpunkt der einzige bekannte, biologisch aktive Bestandteil des Staudenknöterichs. Hierbei handelt es sich um ein Anthrachinon (1,8-Dihydroxy-3-methoxy-6-methylanthrachinon), welches für direkte Vergleiche zum Gesamtextrakt hinsichtlich seiner Wirkung eingesetzt wurde. Verwendet wurde eine Reinsubstanz (Fa. Roth, Karlsruhe) in Konzentrationen von 0,2 ppm, 2 ppm und 20 ppm. Mittlere Angabe entspricht dabei der Menge Physcion, die in einem 1 % Gesamtextrakt gefunden worden ist (Inoue et al. 1992). In Versuchsanordnungen mit mehrstündiger Inkubation von Gurkenblättern in Induktorlösungen kam Physcion nicht zum Einsatz, da die Rohsubstanz in Ethanol (EtOH) aufgelöst werden mußte, welches möglicherweise eine Inaktivierung des pflanzlichen Gewebes hervorgerufen hätte.

#### **2.5.3 Benzothiadiazol**

Benzothiadiazol (Benzo-(1,2,3)-Thiadiazol-7-carbothiosäure-S-methyl-ester, CGA 245704, Fa. Novartis, Basel/Stein, Handelsname BION®) gehört zu den synthetischen Induktoren und

lag als wasserdispergierbares Granulat (WG 50) vor. Sowohl BION als auch dessen Leerformulierung wurden in 0,0125 % Tween 80 gelöst und in Konzentrationen von bis zu 5 mM eingesetzt.

#### **2.5.4 2,6-Dichlorisonicotinsäure**

2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA, CGA 41396, Fa. Novartis, Schweiz) wurde uns freundlicherweise von der AG Prof. Kogel (IPAZ, Universität Gießen) und von der AG Prof. Dehne (Institut für Pflanzenkrankheiten, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei ebenfalls um einen synthetischen Induktor (Métraux et al. 1991), der als formuliertes, wasserdispergierbares Pulver mit 25 % Wirkstoff (WP 25) vorlag. Dieser wurde in den Versuchsreihen bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M eingesetzt.

#### **2.5.5 3,5-Dichlorsalicylsäure**

3,5-Dichlorsalicylsäure lag als körniges Pulver (AG Prof. Ullrich, Technische Universität Darmstadt) vor und wurde in Form einer Bodenapplikation ausgebracht. Die in den Versuchen angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentrationen des Induktors pro Einheit Bodenvolumen. Verwendet wurden 200 cm<sup>3</sup>-Gefäße, die mit 10 ml einer 20fach konzentrierten Lösung gegossen wurden (Endkonzentration im Boden von 100 ppm [parts per million]). Zur Gewährleistung einer vollständigen Sättigung des Bodenvolumens mit DCSA-Lösung wurde der Boden 24-48 h zuvor nicht mehr befeuchtet.

### **2.6 Ausbringungsverfahren**

Da aus der Literatur keine Daten über die Permeation der geprüften Substanzen vorlagen, wurden unterschiedliche Versuchsansätze in Form von vier Biotestverfahren gewählt.

#### **2.6.1 Sprüh- und Gießapplikation**

Bei der Applikation von Substanzen wurde zwischen zwei Ausbringungsarten unterschieden. Eine Sprühapplikation erfolgte an getopften Pflanzen des Zwei- bis Dreiblattstadiums mit einem unter Vakuum stehenden Laborsprüher (Fa. Merck). Die Blätter wurden dazu beidseitig tropfnaß besprüht. Die anschließende Inokulation folgte in der Regel drei Tage später. Eine Gießapplikation wurde nur bei zu testenden Substanzen eingesetzt, von denen bekannt war, daß sie zu ihrem Wirkort (Blattgewebe) transportiert werden. Die optimale Dauer bzw. das Intervall zwischen der Gießapplikation und der Inokulation waren dabei zu ermitteln.

#### **2.6.2 Infiltration**

Bei der Infiltrationstechnik wurden ganze Blätter bzw. ausgestanzte Blattscheiben für ca. 2 Stunden in eine feuchte Kammer gelegt oder mit der Blattunterseite auf eine Wasserschicht aufgesetzt, weil nur im geöffneten Zustand der Schließzellen (Stomata) eine Infiltration

erfolgreich war. Anschließend wurde das Blattmaterial in einen Rundkolben mit Olivenaufsatz gegeben, der die zu infiltrierende Lösung beinhaltet. Diese Apparatur wurde an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und unter Vakuum gesetzt. Die Interzellularräume wurden solange durch wiederholtes Aufheben des Vakuums evakuiert und infiltriert, bis sie gänzlich mit der Lösung gefüllt waren. Zu erkennen war dies an der glasigen, dunkleren und festeren Erscheinung des Blattgewebes. In Biotests, die Reinsubstanzen überprüfen sollten, wurden die infiltrierten Blattgewebe in mit 1 % Wasseragar (Agar Agar) gefüllten Petrischalen ausgelegt und mit *S. fuliginea* durch Überstäuben trocken inokuliert. Zuvor wurden diese auf Filterpapier zur Oberflächenabtrocknung ausgebreitet. Dem Agarmedium war Benzimidazol (30 ppm) zugesetzt zur Verzögerung der Seneszens der Blätter (Limpert et al. 1988). Benzimidazol wurde wegen seiner Hitzeempfindlichkeit erst nach dem Autoklavieren des Mediums bei 121 °C für 20 min zugesetzt. Die Petrischalen wurden bei 16 °C im Klimaschrank aufbewahrt und nach sieben bis zehn Tagen bonitiert.

### 2.6.3 Injektion

Mit der Injektionstechnik wurden in den Biotests nur Kotyledonen behandelt wegen ihres etwas dickeren und strapazierfähigeren Blattgewebes im Vergleich zu den Laubblättern. Die Injektion erfolgte mit einer Nadel (Ø 0,40 mm) blattunterseits in beide Keimblätter einer Gurkenpflanze. Dabei wurde jeweils ein Volumen von ca. 250 µl in das Blatt eingespritzt. Das Eindringen der Flüssigkeit war durch eine Änderung der Blattkonsistenz und -färbung deutlich zu erkennen, die durch das Verdrängen der Luft im Gewebe zustande kam. Pro Keimblatt wurde beidseitig von der Blattader nur jeweils einmal die Injektionsnadel angesetzt, um zu starke Wundreaktionen zu vermeiden. Anschließend wurden die Pflanzen für mehrere Stunden zur Regenerierung ruhig stehengelassen. Eine vollständige Erholung des Blattgewebes war daran zu erkennen, daß die Interzellularräume wieder Luft zogen und die Farbänderung wieder verschwand. Die anschließenden Weiterbehandlungen erfolgten ausschließlich als Sprühapplikation.

## 2.7 Wirkungsgrad von Resistenzinduktoren

Zur Klärung der Signaltransduktionskette von *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt wurde zu Beginn der Wirkungsgrad (WG) dieses biologischen Induktors im direkten Vergleich zu anderen eingesetzten chemischen Induktoren wie z. B. Bion, DCINA und DCSA beobachtet. Dies geschah mittels visueller Bonitur der befallenen Blattfläche durch das jeweilige Pathogen. Dabei wurde die mit Mehltau befallene Fläche in Relation zu der unbefallenen gesunden Fläche gesetzt und prozentual angegeben. Bei normal verlaufender Pathogenentwicklung von *S. fuliginea* wurde der Befall sieben bis zehn Tage nach Inokulation bonitiert, z. T. aufgegliedert in eine 1. und 2. Bonitur. Die Abschätzung folgte einer Boniturvorlage, die in der "Richtlinie für die Prüfung von Fungiziden gegen Echte Mehltäupilze an Zierpflanzen" (Böhmer et al. 1986) zu finden ist. Die Befallserhebung von *B. graminis* f. sp. *hordei* wurde bei normaler Pathogenentwicklung sieben Tage nach Inokulation durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch visuelle Schätzung des

prozentualen Befalls der Blattstücke mit weißem, pusteligem Mycel. Die Boniturskala war in 5er Einheiten unterteilt. Der Wirkungsgrad der Induktor-Behandlungen wurde mit nachstehender Formel berechnet (Abbott 1925):

$$\text{WG [\%]} = \frac{\text{Befall der Kontrolle [\%]} - \text{Befall der Behandlung [\%]}}{\text{Befall der Kontrolle [\%]}}$$

### 2.7.1 System Gurke / *Sphaerotheca fuliginea*

Primärblätter von ca. zwei Wochen alten Gurkenpflanzen wurden mit *R. sachalinensis*-Extrakt (0,1 %, 1 %), Physcion (2 ppm, 20 ppm), DCINA (100 µM) und Bion (250 µM, 500 µM) behandelt. Drei Tage nach dieser Sprühapplikation wurden die Versuchspflanzen mit einer Suspension von *S. fuliginea* inokuliert und bis zur Bonitur unter Gewächshausbedingungen aufbewahrt.

### 2.7.2 System Gerste / *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Primärblätter von zehn Tage alten Gerstenpflanzen der Sorte "Igri" wurden mit unterschiedlichen Induktoren in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Zum Einsatz kamen der Extrakt des Staudenknöterichs als 0,1 %-, 1 %- und 2,5 %-Gabe, der synthetische Induktor DCSA mit 50 ppm, 80 ppm und 100 ppm Bodenendkonzentration und Bion in Konzentrationen von 50, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 und 5000 µM. Als Kontrolle diente eine 0,0125 % Tween 80-Lösung bzw. eine Bion-Leerformulierung (5000 µM). Drei Tage nach der Sprühapplikation des Induktors wurden 3 cm lange Blattstücke aus dem oberen Drittel der Gerstenprimärblätter mittels Skalpell herausgeschnitten und mit der adaxialen Seite nach oben in eine mit Wasseragar gefüllte Glaspetrischale (Ø 25 cm) platziert. Diese wurde anschließend im Inokulationsturm mit Gerstenmehltau im Trockenverfahren inokuliert und bis zur Bonitur unter geregelten Klimabedingungen im Lichtthermostaten aufbewahrt.

## 2.8 Nachweis von Sauerstoffradikalen

### 2.8.1 Quantitative Erfassung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung

Zur Messung der nach Induktion angereicherten Mengen an ROS wurden in Anlehnung an die Methode nach Svalheim & Robertson (1993) Gurkenblattscheiben in den entsprechenden Induktorlösungen inkubiert. Zuvor waren sie zur Streßminderung für mindestens zwei Stunden in Pufferlösung gelagert worden. Die behandelten Blattscheiben wurden anschließend in 1,5 ml 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, pH 6,5) + 1 µg Chloramphenicol/ml bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß 4 h inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 15 µl Phenolrot (1 mg/ml) und 50 µl Meerrettichperoxidase (8,5 Units) mit einer weiteren zweistündigen Inkubation. Abgestoppt wurde mit jeweils 30 µl

1 M Natronlauge (NaOH) und die Extinktion sofort im Spektralphotometer bei 610 nm gemessen. Im System Gurke wurden nachfolgend aufgeführte Varianten untersucht:

1 % *R. s.*-Extrakt, 2 ppm Physcion, 0,1 mM und 1 mM DCINA, 100 µM und 500 µM Bion. In gleicher Weise wurde mit Gerstenblattsegmenten verfahren. Dazu wurden 2 cm lange Blattstücke aus den Primärblättern von sieben bis neun Tage alten Gerstenpflanzen entnommen und mit den Induktorlösungen kurz infiltriert und anschließend inkubiert. Verwendet wurden folgende Varianten: 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt, 100 ppm DCSA und 1000 ppm Bion. Gemessen wurden die nachstehenden Zeitintervalle: ¼ h, ½ h, 1 h, 1¼ h, 1½ h, 2 h, 4 h, 6 h und 15 h. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Oxidation von Phenolrot durch Wasserstoffperoxid, welche durch POX katalysiert wird. Diese Reaktion ist photometrisch in Form eines Extinktionsanstiegs bestimmbar. Nur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches extrazellulär vom pflanzlichen Gewebe abgegeben wird, konnte mit diesem Verfahren erfaßt werden. Dies geschah in Anlehnung an eine zuvor aufgestellte Konzentrationsreihe. Dabei wurde dem Reaktionsgemisch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugesetzt.

### 2.8.2 Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über Fluoreszenz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde mit dem Farbstoff Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) in Gurkenblattgewebe nach Diersch et al. (1998) detektiert. Das Gurkenblattgewebe wurde zu diesem Zweck mit 0,5-1 mM DHR 123 inkubiert, welches in N, N-Dimethylformamid (DMF, 43,3 mM Stammlösung) gelöst wurde. Die optimale Einwirkungszeit wurde innerhalb einer Versuchsreihe ermittelt. Anschließend wurde das Blattmaterial mit einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt oder einer Konzentrationsreihe von Cantharidin behandelt, um die intrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung zu stimulieren. Als Positivkontrolle wurde eine 1000 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung eingesetzt. Die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte durch die Oxidation von DHR beobachtet werden. Dazu erfolgte eine Messung der Fluoreszenzintensität bei 530 nm. Blattgewebe, welches nur mit DHR 123 behandelt wurde, stellte das Grundniveau an produziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dar.

### 2.8.3 Nachweis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Tissue-Printing

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde mit Tissue-Printing-Verfahren in Gurkenblattgewebe nachgewiesen in Anlehnung an die Methode nach Schopfer (1994). Dabei machte man sich zu Nutzen, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Jodidionen zu elementarem Jod oxidiert, welches mit Stärke einen sichtbaren Farbkomplex bildete (Olson & Varner 1993). Zu diesem Zweck wurde eine Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) mit einer Porengröße von 0,2 µm präpariert, indem eine viskose Stärkelösung (10 %, w/v) mit Zusatz von 0,5 M Kaliumjodid auf diese geschichtet und mit Heißluft schonend getrocknet wurde. Die Membranen wurden sofort verwendet, da diese zu Autoxidation neigten. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag bei 0,1-0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Der Gewebeabdruck erfolgte mit der Unterseite des behandelten Blattes auf die Membran unter leichtem, konstantem, mechanischem Druck.

### 2.8.4 Histologischer Nachweis von $\text{H}_2\text{O}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2$  konnte auch direkt nachgewiesen werden in Anlehnung an eine Methode von Thordal-Christensen et al. (1997). DAB (3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) polymerisierte dabei an den Stellen, wo es mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Anwesenheit von Peroxidase in Kontakt kam. Zellen können gelöstes DAB aufnehmen, so daß eine *in vivo*- und *in situ*-Detektion des relativ kurzlebigen  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf zellulärer Ebene möglich war. Das dabei entstehende rotbraune DAB-Polymer war sehr stabil und unlöslich. Zu diesem Zweck wurde das Blattgewebe 3 h im Licht in einer 0,1 % DAB-Lösung (pH 3,8) inkubiert. Die Entfärbung erfolgte wie unter Kapitel 2.8.5 beschrieben. Alternativ dazu wurde ein Chlorophyllentzug aus den Blättern durch Einlegen in eine EtOH-Lösung durchgeführt.

### 2.8.5 Histologischer Nachweis von $\text{O}_2^-$

Da die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion über die Bildung von  $\text{O}_2^-$  geschieht (Stich & Ebermann 1984), wurde dieses Sauerstoffradikal näher untersucht. Die  $\text{O}_2^-$ -Bildung konnte durch Akkumulation von blauem Formazan detektiert werden. Dabei erfolgte der Nachweis von Superoxid durch die schnelle Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium bei 30 min Belichtung. Der Farbstoff wurde dazu in das Blattgewebe infiltriert oder in die Blätter injiziert (Ádám et al. 1989). Die anschließende Entfärbung des Blattmaterials erfolgte in einem Gemisch aus Trichloressigsäure, Ethanol und Chloroform für 48 h. Nach 24 h wurde die Entfärbelösung erneuert (Wolf & Fric 1981). Die Fixierung, falls notwendig, geschah durch Einlegen in eine 50 % Glycerinlösung. Das Blattgewebe wurden vor der Färbung zum Streßabbau für mindestens 2 h in 10 mM MES-Puffer aufbewahrt.

Entfärbelösung:

- 0,15 g (w/v) 0,15 % Trichloressigsäure
- + 80 ml (v/v) Ethanol
- + 20 ml (v/v) Chloroform

NBT-Lösung:

- 0,1 % NBT (w/v)
- + 10 mM  $\text{NaN}_3$  (Natriumazid)
- + 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8)

## 2.9 Nachweis von Stickstoffradikalen

Zur Quantifizierung der endogenen NO-Bildung in der Pflanze nach Induktion wurden die Methoden nach Murphy & Noack (1994) und Delledonne et al. (1998) eingesetzt. Die Technik basiert auf der direkten Reaktion zwischen NO und Oxyhämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ), was dann zu Methämoglobin (metHb) und Nitrat reagiert. Die theoretische untere Detektionsgrenze für NO liegt bei 1,3 nM. Diese empfindliche und spezifische Methode wurde zuerst von Haussmann & Werrigloer (1985) eingesetzt und später von Feelisch & Noack (1987) fortgeführt. Sie wurde ursprünglich genutzt, um die Freisetzung von NO aus verschiedenen



stickstoffhaltigen Verbindungen zu demonstrieren. Später wurde damit die NO-Bildung durch Stickoxidsynthase (NOS) in Geweben, Zellen und Extrakten gemessen.

### 2.9.1 Probenaufarbeitung

0,5 g frisches Blattmaterial von Gurkenpflanzen wurde mit jeweils 500 µl Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt und im kalten Mörser homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend 15 min bei 4 °C und 20000 g niedrigtourig abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Probe weiter aufgearbeitet.

#### Säulenvorbereitung:

3 g Sephadex G25-150 wurden in 15 ml Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) gelöst, vorsichtig mit einem Glasstab umgerührt und über Nacht stehen gelassen zwecks Quellung der Trockenperlen. Mit den mit Pufferlösung gesättigten Perlen wurde anschließend eine Glas-Chromatographiesäule (Fa. Fisher-Scientific, Länge 20 cm, Ø 1 cm, Glasfritte mit Porengröße 0) gepackt und mit der Pufferlösung mehrmals equilibriert.

#### Herstellung von Oxyhämoglobin:

25 mg bovines Hämoglobin in 1 ml Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) lösen, vorsichtig schütteln (Schaumbildung vermeiden), 1-2 mg Natriumdithionit hinzufügen, erneut aufschütteln und O<sub>2</sub> in die Lösung einführen. Das oxidierte Hämoglobin wurde anschließend auf die Chromatographiesäule aufgetragen und mit Pufferlösung eluiert. Dabei ist die Durchlaufgeschwindigkeit auf 1 ml/min einzustellen, so daß die Hämoglobin-Bande nach ca. 10 min eluiert ist. Die Hauptbande wurde in einem Szintillationsgefäß aufgefangen. Die Qualität und Reinheit des Oxyhämoglobins wurde photometrisch überprüft. Dazu erfolgten Messungen bei 413 nm und 415 nm. Die so hergestellte Stammlösung hat eine Konzentration von ca. 1 mM HbO<sub>2</sub>. Die Lösung wurde wegen Autoxidation täglich kurz vor Gebrauch neu angesetzt. Diese Stammlösung wurde zum Gebrauch auf eine Konzentration von 10 µM mit Phosphatpuffer verdünnt.

### 2.9.2 Quantitative Bestimmung von NO

50 µl der vorbereiteten Probe wurden mit SOD (100 U Endkonzentration) und CAT (100 U Endkonzentration) gemischt und 5 min inkubiert. Anschließend wurden 5-10 µM hergestelltes Oxyhämoglobin (Endkonzentration) hinzugefügt und für weitere 2 min inkubiert. Die photometrische Messung von Stickoxid erfolgte bei 401, 411 und 421 nm, wobei die jeweiligen Differenzen gebildet wurden. Diese zeigten dann die Änderung in der Absorption an, die für die Umsetzung von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin bei NO-Anwesenheit steht.

### 2.10 Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-liefernden Substanzen

Mit dem Einsatz von Wasserstoffperoxid-liefernden chemischen Verbindungen sollte geklärt werden, inwieweit diese die induzierende Wirkung von *R. sachalinensis* ersetzen können. Dabei kamen zum einen Substanzen zum Einsatz, die *per se* zu den Radikalverbindungen

gehörten, zum anderen solche, die die Bildung von Radikalen förderten, indem sie die Vorstufen des oxidativen Bursts aktivierten.

### 2.10.1 Externes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) wurde extern in den Konzentrationen 100 mM, 1000 mM und 2000 mM im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle auf Gurkenpflanzen appliziert, welche dann drei Tage später mit Gurkenmehltau inokuliert wurden. Diese Konzentrationsstufen wurden in Vorversuchen ausgetestet. Geringere Mengen als 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ließen das Risiko bestehen, daß eine Befallsänderung durch die Behandlung als solche nicht nachzuweisen war aufgrund der Tatsache, daß ein Anteil der ausgebrachten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen an der Luft instabil wird und diese keine Wirkung mehr zeigen. Höhere Dosen als hier angewandt wirkten gänzlich schädigend auf das Gurkenblattgewebe. Der Bereich zwischen 1000 mM und 2000 mM spiegelte die Phytotoxizitätsgrenze wider, erkennbar durch Effekte wie Blattrandnekrosen und Nekrosen in der Blattfläche. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde zur besseren Haftung des Wirkstoffes auf der Blattoberfläche mit dem Formulierungshilfsstoff Tween 80 (0,0125 %) angesetzt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde unter anderem auch mit den Biotestverfahren Infiltration und Injektion ausgebracht.

### 2.10.2 Proteinphosphatase-Inhibitor

Der Proteinphosphatase-Inhibitor Cantharidin (Exo, exo-2,3-dimethyloxybicycloheptan-2,3-dicarboxylsäure-Anhydrid) wurde in Gurkenblätter in Konzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM infiltriert bzw. in Kotyledonen injiziert, und die Blätter wurden anschließend je nach Variante mit *R. sachalinensis*-Extrakt besprüht und mit *S. fuliginea* inokuliert. Die Anwendungsmengen sollten für jedes Wirt-Pathogen-System ausgearbeitet werden, da Cantharidin in zu hohen Dosen eine herbizide Wirkung hervorruft. Die hier angewandten Konzentrationen waren so gewählt, daß keine phytotoxischen Effekte auftraten. Wegen der Wasserunlöslichkeit von Cantharidin waren nur folgende Lösungsmittel möglich:

1 g Cantharidin ⇒ 40 ml Aceton, 65 ml Chloroform, 560 ml Ether oder 150 ml Ethylacetat  
(Fa. ICN)  
⇒ Dimethylsulfoxid (DMSO) oder EtOH (Fa. Sigma)

Diese Stammlösungen konnten anschließend mit 0,0125 % Tween 80 verdünnt werden.

### 2.10.3 Redoxaktiver Farbstoff

Der redoxaktive Farbstoff Rhodamin B gehört zur Gruppe der synthetischen Photosensitizer. Er wurde in den unterschiedlichen Biotestverfahren in Konzentrationen von 1 µM, 10 µM und 30 µM eingesetzt.

## 2.11 Einsatz von Radikalfängern

Mit dem Einsatz von Radikalfängern sollte in Verbindung mit einer *R. sachalinensis*-Behandlung die durch den Extrakt induzierte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung unterbunden bzw. das produzierte  $\text{H}_2\text{O}_2$  abgefangen werden. Dies wurde zum einen durch Befallserhebungen quantifiziert, zum anderen durch photometrische Messungen analysiert. Als Radikalfänger wurden Vitamin C und Vitamin E in Reinsubstanz verwendet, außerdem ein formuliertes Vitamin E-Präparat und das Salz der Ascorbinsäure (Ascorbat).

### 2.11.1 Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist in der Lage als Radikalfänger zu fungieren. Es kann auf direktem Weg  $\text{O}_2^\cdot$  bzw.  $\text{OH}^\bullet$  wegfangen und schon gebildetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  über die Ascorbat-Peroxidase entgiften. In den Biotests wurden Mengen von 1-10 mM angewandt, gelöst in 0,0125 % Tween 80. Aufgrund der hohen Instabilität und der Lichtempfindlichkeit der Substanz wurde diese täglich frisch angesetzt und im Dunkeln aufbewahrt.

### 2.11.2 $\alpha$ -Tocopherol

$\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) gehört ebenfalls der Gruppe der Radikalfänger an. Die antioxidative Wirkung beruht neben seiner Scavenger-Funktion auf der Komplexbildung mit Lipoxygenasen, wodurch die Oxidation der entsprechenden Fettsäure gehemmt werden kann (Schmitz & Noga 1997; Grossman & Waksman 1984; Fukuzawa 1987; Erin et al. 1985). Angewandt wurden Konzentrationen von 1-10 mM. Da es sich hierbei um ein fettlösliches Vitamin handelt, mußte dieses in 8 % EtOH angelöst werden.

### 2.11.3 Plantacur-E

Bei dem zum Einsatz gekommenen formulierten Vitamin E-Präparat handelte es sich um das Handelsprodukt PLANTACUR-E\*, welches uns freundlicherweise von Prof. Noga (Versuchsstation für Obstbau 302, Bavendorf, Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt wurde. Bei der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft ist es unter der Nummer SM 0092-00-00 registriert worden, in Österreich erfolgten Vermarktung und Distribution über afaplant Handels-GmbH, Graz und in Italien über die Fa. Gobbi, Genua. Plantacur-E dient zur Unterstützung des pflanzeeigenen Abwehrsystems gegen Streß und insbesondere zur Verminderung der Auswirkungen von z. B. hohen Lichtintensitäten, Hitze, Kälte, Trockenheit, Ozon oder UV-B-Strahlung. Das Präparat beinhaltet zu 25 % die Wirksubstanz  $\alpha$ -Tocopherol und aufgrund der speziellen, weiteren Zusammensetzung wird das im Mittel enthaltene Vitamin E sehr gut in die Pflanze aufgenommen. In der Praxis wird Plantacur-E gegen Pilzkrankheiten wie Apfelschorf, Mehltau etc. in einer Dosis von 0,5-0,7 l/ha zu Fungizid-Spritzbrühen hinzugegeben. Das Präparat wurde in Verdünnungen von 1:10 bis 1:1000 eingesetzt, womit es im Vergleich zur Reinsubstanz Vitamin E sehr gering dosiert angewandt wurde.

Leerformulierung:

- 25 % RRR-alpha-Tocopherol (Wirksubstanz)
- 18 % Rizinusöl (Emulgator)
- 24,5 % Alkohol (Lösungsmittel)
- 15,5 % Hydrosol P 180 EA (aromatenfreies Lösungsmittel;  $\equiv$  Shelsol D 60)
- 7 % N-Methyl-2-pyrrolidon (Penetrationsförderer)
- 10 % Tween 20 (Aufnahmeförderer)

## 2.12 Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inhibitoren

Als Vertreter der Hemmstoffe wurden drei Substanzen eingesetzt, die auf unterschiedliche Art und Weise in die Bildung von Wasserstoffperoxid eingreifen. In Kombination mit einer *R. sachalinensis*-Behandlung sollte geklärt werden, ob die durch den Extrakt induzierte Bildung von Radikalen partiell oder gänzlich unterbunden werden kann.

### 2.12.1 Proteinkinase-Inhibitor

Der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin, speziell ein Serin-Threonin-Kinase-Hemmstoff, unterbindet die Phosphorylierung von Proteinen. Nach Herstellerangaben wurde dieser in Methanol (MeOH) oder DMSO angelöst. Verwendet wurden Konzentrationen von 0,1-0,2  $\mu$ M. Seine Wirkung wurde sowohl durch Befallserhebungen im Biotest untersucht als auch durch photometrische Messungen gebildeter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen erfaßt.

### 2.12.2 Xanthinoxidase-Inhibitor

Der Xanthinoxidase-Inhibitor Allopurinol (4-hydroxypyrazolo[3,4-d]pyrimidin) wird in der Literatur als ein Hemmstoff beschrieben, der *in vitro* und *in vivo* eine feste Bindung mit dem reduzierten Molybdänkomplex der Xanthinoxidase eingeht (Montalbini 1992 a, 1992 b, Montalbini & Della Torre 1993, Hille & Massey 1981; Massey et al. 1970). Allopurinol wurde zusätzlich zu den üblichen Biotestverfahren als Gießapplikation eingesetzt, da es sehr gut über die Wurzeln aufgenommen werden kann und von dort innerhalb der gesamten Pflanze transportiert wird. Es wurden Mengen von 200-400  $\mu$ M verwendet, wobei letztere Konzentrationsstufe die maximale Löslichkeit dieser Substanz darstellt (pers. Mitteilung Peters, RWTH Aachen). Die Gießapplikation beinhaltete auch Versuche zu verschiedenen Zeitintervallen zwischen Gießzeitpunkt und Applikation des Extrakts. Bei Variante A wurden die Gurken sieben Tage lang mit Allopurinol gewässert und anschließend mit Extrakt besprüht. Bei Variante B fielen der Zeitpunkt des Gießens und der Ausbringung des Induktors zusammen. Vor Versuchsbeginn wurden die Pflanzen ein bis zwei Tage nicht befeuchtet, um eine maximale Aufnahme der Substanz zu gewährleisten.

### 2.12.3 NADPH-Oxidase-Inhibitor

In weiteren Experimenten sollte die Bedeutung der NADPH-Oxidase näher untersucht werden. Dazu wurde Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) eingesetzt, welches ein Hemmstoff der Flavoprotein-Komponente der neutrophilen NADPH-Oxidase ist (Alvarez et al. 1998; Bolwell et al. 1995; Bolwell & Wojtaszek 1997; Kawano et al. 1998; Kiba et al. 1997; Nürnberger et al. 1997). Nach pers. Mitteilung (Jabs, RWTH Aachen) ist DPI durch Infiltration bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  einsetzbar. Ab einer Dosis von 2  $\mu\text{M}$  kann es jedoch in bestimmten Wirt-Pathogen Systemen bakteriostatisch wirken. Verwendet wurden Mengen von 1-2  $\mu\text{M}$ , hergestellt aus einer 1000fach konzentrierten Stammlösung, welche bei -20 °C in DMSO eingefroren wurde. In Vorversuchen zeigte sich besonders bei Injektion von DPI in Gurkenkotyledonen, daß Gurkengewebe auf Mengen von 2-10  $\mu\text{M}$  DPI mit Phytotoxizität reagieren. Verstärkt wurden dabei die Symptome nach Inokulation der Pflanzen mit *S. fuliginea*.

### 2.13 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts (Bradford 1976) von Blattmaterial, welches für die Analyse der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten homogenisiert worden war, wurden jeweils 5 ml Bradford-Reagenz mit 100  $\mu\text{l}$  Enzymrohextrakt gemischt, 2-5 min inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Als Referenzgröße wurde sowohl mit Rinderserumalbumin Fraktion V (BSA) als auch mit einem Proteinstandard (Protein Assay Standard II, Fa. Bio-Rad) eine Eichreihe aufgestellt für den Konzentrationsbereich 0,1-0,5 mg Protein/ml. Das Bradford-Reagenz wurde wie folgt hergestellt:

- ⇒ 25 mg Coomassie Brilliant Blue G 250
- ⇒ in 12,5 ml 95 % EtOH (v/v) lösen
- ⇒ 25 ml 85 % ortho-Phosphorsäure (v/v) hinzugeben
- ⇒ mit A. dest. auf ein Volumen von 250 ml auffüllen
- ⇒ nach 24 h abfiltrieren und kühl aufbewahren.

### 2.14 Aufarbeitung von Enzymen des $\text{H}_2\text{O}_2$ -Metabolismus

Die Aufarbeitung der Enzymproben erfolgte entweder aus frischem Blattgewebe behandelter Pflanzen oder aus Blattmaterial, welches in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur anschließenden Homogenisierung bei -20 °C aufbewahrt wurde. Dies war abhängig von der Stabilität der jeweiligen Enzymaktivität.

#### 2.14.1 Peroxidase

Die Enzymrohextrakte wurden wie folgt hergestellt (Arras 1998):

- ⇒ tiefgekühltes Blattmaterial in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (nach Sörensen) unter Zusatz von 1 % Polyvinylpyrrolidon (w/v, PVPP), 0,1 M Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)

und 0,1 M Dithiothreitol (DTT) im tiefgekühlten Mörser zerkleinern; Zugaben dienen der Stabilisierung des Enzyms und der Inaktivierung freier Phenole;

⇒ Zentrifugation für 30 min bei 9200 rpm und 4 °C (Fa. Beckman, Typ J2-21 M/E, Festwinkelrotor JA 20);

⇒ Überstand für 10 min bei 14000 rpm und 4 °C niedrigtourig zentrifugieren (Fa. Eppendorf, Typ 5417 R);

⇒ Gewinnung des Überstandes als Enzymrohextrakt.

### **2.14.2 Catalase**

Die Herstellung der Enzymrohextrakte zur Messung der Catalaseaktivität erfolgte wie unter Kapitel 2.14.1 beschrieben.

### **2.14.3 Superoxiddismutase**

Herstellung der Enzymrohextrakte siehe Kapitel 2.14.1

### **2.14.4 Glutathionreduktase**

Die Herstellung der Enzymrohextrakte wurde folgendermaßen durchgeführt:

⇒ frisches Blattmaterial in 0,12 M Phosphatpuffer (pH 7,2) unter Zusatz von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) im tiefgekühlten Mörser mit einem Pistill zerreiben; Zugabe soll unter oxidierenden Bedingungen die mögliche Bildung von größeren molekularen Aggregaten verhindern, welche zu einer Abnahme der Enzymaktivität führen können.

⇒ Blatthomogenate in einer 0,5 M Saccharoselösung, welche in 50 mM Trishydroxymethylethansulfonsäure (TRIS)-HCl-Puffer (pH 7,5) angesetzt wurde, 30 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugieren (nach Foyer & Halliwell 1976);

⇒ Überstand 10 min bei 14000 rpm und 4 °C niedrigtourig zentrifugieren (Fa. Eppendorf, Typ 5417 R);

⇒ Gewinnung des Überstandes als Enzymrohextrakt.

### **2.14.5 Glutathion-S-transferase**

Herstellung der Enzymrohextrakte siehe Kapitel 2.14.4

### **2.14.6 Chalkonisomerase**

Der Rohextrakt zur Messung der enzymatischen Aktivität wurde wie folgt vorbereitet:

⇒ frisches Blattmaterial wurde in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) unter Zusatz von 1,4 mM Mercaptoethanol und gleichem Gewichtsvolumen von Anionenaustauscher Dowex 1x2 (stark basisch, 50-100 mesh, Cl-Form) wie Blattmaterialmenge;

⇒ Überstand 10 min bei 14000 rpm und 4 °C niedrigtourig zentrifugieren (Fa. Eppendorf, Typ 5417 R);

⇒ Gewinnung des klaren und fast farblosen Überstandes als Enzymrohextrakt.

Vergleichend dazu wurde auch eine Probenvorbereitung ohne Zusatz eines Anionenaustauschers angesetzt.

## **2.15 Aufarbeitung von Enzymen außerhalb des $\text{H}_2\text{O}_2$ -Metabolismus**

### **2.15.1 API-ZYM**

Die Vorbereitung des Untersuchungsmaterials umfaßte folgende Arbeitsschritte:

⇒ 0,3 g Gurkenblattgewebe wurden im eisgekühlten Mörser in 500 µl steriler, physiologischer Kochsalzlösung (nach Casper & Meyer 1981) homogenisiert;

⇒ Überstand 10 min bei 14000 rpm und 4 °C niedrigtourig zentrifugieren (Fa. Eppendorf, Typ 5417 R);

⇒ Verwendung des Überstandes als Untersuchungsmaterial.

physiologische Kochsalzlösung (pH 7,4):

- 8,0 g NaCl

- + 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

- + 2,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$

- + 0,2 g KCl

- + 0,2 g  $\text{NaN}_3$  (nur bei längerer Lagerung notwendig)

- + auf 1 l mit A. dest. auffüllen, pH-Einstellung und 20 min bei 121 °C sterilisieren.

## **2.16 Aktivitätsmessung von $\text{H}_2\text{O}_2$ -metabolisierenden Enzymen**

Nachfolgend werden die wichtigsten Enzyme des antioxidativen Schutzsystems in Pflanzen analysiert. Desweiteren erfolgte ein großangelegtes Screening von Enzymen, welche eventuell durch die induzierende Wirkung eingesetzter Substanzen eine erhöhte Aktivität aufweisen könnten. Die schon vorliegenden Daten über Aktivitätsmessungen von POX, CAT und SOD (Fritz 1996) bezogen sich nur auf das System Induktor-Pflanze. Ergänzend dazu wurden hier nun Messungen durchgeführt, die den Zeitraum des oxidativen Bursts untersuchen und bei denen das Pathogen miteinbezogen wurde.

### **2.16.1 Peroxidase**

$\text{H}_2\text{O}_2$  kann *in vivo* durch substratspezifische oder unspezifische Peroxidaseaktivität zu Wasser reduziert werden. Andererseits können Peroxidasen auf Kosten verschiedener Elektronendonatoren, vor allem NADH oder NADPH, Sauerstoff reduzieren, wobei  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht. Angewandt wurde die Methode nach Pütter (1974) in einem leicht modifizierten Verfahren. Verwendet wurde das farblose Substrat Guajacol (2-Methoxyphenol), welches bei POX-Anwesenheit in das farbige Tetramer Oktahydrotetraguajacol umgewandelt wird. Die Bildung dieses Guajacol-Dehydrogenierungsproduktes kann photometrisch bei 436 nm anhand einer Extinktionszunahme verfolgt werden.

Reaktionsgemisch:

- 2000 µl 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)
- + 100 µl 1 % (v/v) Guajacol
- + 10 µl 4,25 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- + 100 µl Enzymrohextrakt

### 2.16.2 Catalase

Die Catalase ist ein Enzym mit Doppelfunktion. Sie katalysiert zum einen die Zerlegung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Wasser und O<sub>2</sub> (= katalytische Aktivität), zum anderen beschleunigt sie die Oxidation von H-Donatoren unter Verbrauch von 1 mol Peroxyd (= peroxidische Aktivität). Welche der beiden Reaktionen vorherrscht, hängt von der H-Donorkonzentration und der Produktionsrate an Wasserstoffperoxid im System ab. Die Catalaseaktivität kann entweder durch Verfolgung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung oder der O<sub>2</sub>-Freisetzung gemessen werden. Ersteres Nachweisverfahren wurde hier angewandt. Die Messung erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Aebi (1974) in der AG Prof. Ullrich (Technische Universität Darmstadt). Das Prinzip besteht darin, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Ultraviolett(UV)-Bereich eine mit abnehmender Wellenlänge stetig stärker werdende Absorption zeigt. Durch Messung der Extinktionsabnahme bei 240 nm (Quarzküvette) läßt sich die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung direkt beobachten, wobei die pro Zeiteinheit gemessene Differenz ( $\Delta E_{240}$ ) als Maß für die CAT-Aktivität dient.

Reaktionsgemisch:

- 2800 µl 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)
- + 100 µl 1 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- + 100 µl Enzymrohextrakt

### 2.16.3 Superoxiddismutase

Dieses Enzym katalysiert die Dismutation (Breakdown) von O<sub>2</sub><sup>-</sup> zu molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (McCord & Fridovich 1969; Halliwell 1974). Deswegen wird vermutet, daß diese Reaktion unter anderem die Lipidperoxidation kontrolliert (Elstner et al. 1987). Die Messung der SOD-Aktivität erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Beauchamp & Fridovich (1971) in der AG Prof. Ullrich (Technische Universität Darmstadt), die Probennahme und -aufbereitung wurde nach Dhindsa et al. (1981) durchgeführt. Die Analyse der Aktivität geschah photometrisch, wobei die photochemische Reduktion von Nitroblautetrazolium (NBT) verfolgt wurde. Gemessen wurde die Absorption bei 560 nm, nachdem die Proben 30 min unter einer Fluoreszenzlampe (UV-Licht) inkubiert worden waren. Je höher die Enzymaktivität, desto geringer war die Farbentwicklung (gelb). Maximale Färbung (blau) wurde bei fehlendem Enzym erreicht. Die Meßergebnisse können zum einen als relative Aktivitätsänderung, zum anderen als relative Farbänderung dargestellt werden.



Reaktionsgemisch:

- 3000 µl 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)
- + 10 µl Enzymrohextrakt
- + 13 mM Methionin (DL-Form)
- + 75 µM NBT
- + 2 µM Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>)
- + 100 µM EDTA

#### 2.16.4 Glutathionreduktase

Bei diesem Enzym handelt es sich um ein Flavoprotein mit einem FAD-Bestandteil. Seine Funktion ist die Aufrechterhaltung der intrazellulären reduzierten Glutathion (GSH)-Konzentration, welche für die direkte Reduktion von oxidierten Protein-Thiol-Gruppen, z. B. in Enzymen, bereitstehen muß (Goldberg & Spooner 1987). Die GR-Aktivität wurde in Anlehnung an die Methode nach Goldberg & Spooner (1987), Foyer & Halliwell (1976) und Ellner (pers. Mitteilung) durch spektrophotometrische Bestimmung bei 339 nm (Quarzküvette) gemessen. Die Probenaufbereitung ist wie in Foyer & Halliwell (1976) erfolgt. Die katalytischen Enzymkonzentrationen  $b$  (nkat/l) wurden mit nachstehender Formel berechnet:  $b = F_2 \times \Delta A / \Delta t$  [ $F_2 = 7,80 \times 10^4$ ;  $\Delta A / \Delta t$  = Extinktionsänderung innerhalb einer bestimmten Zeitspanne]. Der nicht-enzymatische Zerfall wurde durch das Weglassen von GSSG (oxidiertes Glutathion) im Reaktionsgemisch bestimmt.

Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 3 ml) nach Foyer & Halliwell (1976):

- 3 µM EDTA
- + 10 µl Enzymrohextrakt
- + 10 mg GSSG
- + 260 µM Tris (HCl)-Puffer (pH 7,5)
- + 0,3 mg NADPH

Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 2,95 ml) nach Goldberg & Spooner (1987):

- 2600 µl 0,12 M Phosphatpuffer (pH 7,2)
- + 100 µl 15 mM EDTA
- + 50 µl 9,6 mM NADPH
- + 100 µl 65,3 mM GSSG
- + 100 µl Enzymrohextrakt

NADPH wurde erst nach Mischung der anderen Substanzen einschließlich einer 5minütigen Inkubation bei 37 °C zugegeben.

#### 2.16.5 Glutathion-S-transferase

Dieses Enzym katalysiert die Konjugation von u. a. hydrophoben, toxischen Verbindungen mit Glutathion, um nicht-toxische Peptid-Derivate zu bilden (Dixon & Lamb 1998).

Die Probenvorbereitung wurde nach Foyer & Halliwell (1976) durchgeführt. Die Aktivitätsmessung erfolgte nach Habig et al. (1974) und Mauch & Dudler (1993). Die Enzymaktivität konnte durch die Extinktionszunahme in einem Zeitraum von 3 min bei 340 nm (Quarzküvette) und 25 °C beobachtet werden. Die Messung des nicht-enzymatischen Zerfalls wurde durch das Entfernen von GSH im Reaktionsgemisch durchgeführt.

Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 1 ml) nach Habig et al. (1974):

- 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (pH 6,5)
- + 1 mM GSH
- + 1 mM CDNB (1-Chlor-2,4-dinitrobenzol)
- + 50 µl Enzymrohextrakt

Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 1 ml) nach Mauch & Dudler (1993):

- 100 µM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5)
- + 1 µM CDNB
- + 1 µM GSH
- + 50 µl Enzymrohextrakt

CDNB wurde zuvor in 4 % EtOH vorgelöst, wobei die maximale Löslichkeit bei 100 mg/100 ml Ethanol lag.

#### **2.16.6 Chalkonisomerase**

Die Chalkonisomerase (CHI) katalysiert die Umwandlung von Naringenin-Chalkon zu Naringenin, eine Reaktion in der Flavonoid-Biosynthese (Moustafa & Wong 1967; Spribille & Forkmann 1981). Die Probenaufbereitung erfolgte nach Forkmann & Kuhn (1979), die Messung der CHI-Aktivität wurde in Anlehnung an Forkmann & Kuhn (1979) und Hinderer et al. 1983; Hinderer & Seitz 1985) durchgeführt. Dabei wurde die Abnahme der Extinktion vom Naringenin-Chalkon-Absorptionsmaximum (385 nm) über den Zeitraum von 1 min bei 30 °C festgehalten.

Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 1,65 ml) nach Forkmann & Kuhn (1979):

- 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 8,0)
- + 0,17 mM Chalkon
- + 50 µl Enzymrohextrakt

Reaktionsgemisch (Gesamtvolumen 1 ml) nach Hinderer et al. (1983, 1985):

- 970 µl 100 mM Phosphatpuffer (pH 8,0)
- + 1,4 mM Mercaptoethanol
- + 10 µl 0,17 mM Chalkon
- + 20 µl Enzymrohextrakt

Chalkon wurde in Ethylenglycolmonomethylether (EGME) vorgelöst, wobei die Löslichkeit bei 1 mg/ml EGME lag.

## 2.17 Aktivitätsmessung von Enzymen außerhalb des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Metabolismus

### 2.17.1 API-ZYM

API-ZYM ist eine Mikromethode (Fa. BioMérieux, Nürtingen) zum semiquantitativen Nachweis von enzymatischen Aktivitäten. Die Technik eignet sich für eine große Vielfalt von Untersuchungsmaterialien (Gewebe, Zellen, biologische Flüssigkeiten, Mikroorganismen, Bodenproben). Es erlaubt den schnellen und systematischen Nachweis von 19 Enzymen in sehr geringen und nicht-vorgereinigten Probenmengen. Es wird normalerweise nur verwendet, um Materialien auf Enzyme durchzuprüfen, die danach bei Bedarf mit anderen Verfahren quantitativer untersucht werden. Bei den im Screening-Verfahren stehenden Enzymen handelte es sich um 19 Hydrolasen:

- 3 Phosphatasen (alkalisch, sauer, phosphoamidasisch)
- 3 Aminopeptidasen
- 3 Esterasen
- 2 Proteinasen
- 8 Glycosidasen

Die Vorbereitung der Proben erfolgte in Anlehnung an die Empfehlung des Herstellers. Gurkenblätter wurde dazu in physiologischer Kochsalzlösung (nach Casper & Meyer 1981) homogenisiert und anschließend niedrigtourig abzentrifugiert. Ein Teststreifen wurde jeweils mit einer Probe beimpft und anschließend 4 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von ZYM A- und ZYM B-Reagenz wurden diese für kurze Zeit einer starken Lichtquelle (1200 Watt) ausgesetzt, wodurch sich das überschüssige Reagenz entfärbt und negative Reaktionen farblos werden. Untersucht wurden sowohl nur induzierte Gurken (1 % R. *sachalinensis*, 1000 ppm Bion) als auch induzierte Pflanzen mit Mehltaubefall und *S. fuliginea*-Infektionen *per se* im Zeitraum von ein bis sieben Tagen.

ZYM A-Reagenz:

- 25 g Tri-hydroxy-Methyl-Amino-Methan
- + 11 ml HCl (37 %)  
+ 10 g Laurylsulfat  
+ auf 100 ml mit A. dest. auffüllen.

ZYM B-Reagenz:

- 0,35 g Fast Blue BB
- + auf 100 ml mit 2-Methoxy-ethanol auffüllen.

Die API ZYM-Streifen wurden bis zur Verwendung bei 2-8 °C gelagert. ZYM A-Reagenz wurde bei 8-30 °C aufbewahrt, da es bei geringeren Temperaturen einen Niederschlag bildete, der wiederum bei 60 °C aufgelöst werden mußte. ZYM B-Reagenz wies eine hohe Lichtempfindlichkeit auf. Die Auswertung der Farbreaktionen geschah visuell. Dabei erhielten die Reaktionen entsprechend der Ablesetabelle die Werte von 0-5, je nach Intensität der Farbe. Null entspricht einer negativen Reaktion, fünf der am stärksten Positiven. Die Bewertung kann mit dieser Methode semiquantitativ vorgenommen werden. Der Wert eins

entspricht ca. 5 nM, zwei 10 nM, drei 20 nM, vier 30 nM und fünf 40 nM. Die Farbreaktionen blieben nach Zugabe der Reagenzien mehrere Stunden stabil. Die Streifen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und aufbewahrt.

## **2.18 Elektrophorese**

### **2.18.1 Proteinextraktion**

Die Proteinextraktion von Proben, die mittels isoelektrischer Fokussierung untersucht werden sollten, wurde nach Croft et al. (1990) durchgeführt. Dieses Verfahren sicherte die Erhaltung der Enzymaktivität. Dazu wurden 0,25 g frisches Blattmaterial in flüssigem N<sub>2</sub> zermahlen und nach Zugabe von 1 ml Pufferlösung 15 min bei 4 °C unter Rühren extrahiert. Anschließend wurden die Homogenisate 15 min und 4 °C niedrigtourig zentrifugiert (17.000 g). Die gewonnenen Überstände wurden über eine Sephadex-Säule (Fa. Pharmacia PD-10 oder Sephadex G-25 M) mit Elutionspuffer gereinigt.

Extraktionspuffer:

- 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)
- + 1 % (w/v) PVP 40 (Polyvinylpyrrolidon)
- + 0,1 % (v/v) Triton X-100 (Octylphenoxypolyethoxyethanol)
- + 0,04 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Natriummetabisulfit, Natriumpyrosulfit)

Elutionspuffer:

- 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)

### **2.18.2 Isoelektrische Fokussierung von Enzymen des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Metabolismus**

Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung von Proteinen besteht darin, daß das Protein im Gel bis zu dem Punkt wandert, wo der pH-Wert liegt, der seinem isoelektrischen Punkt entspricht. An dieser Stelle ist das Protein elektrisch neutral. Damit können Formen von ein- und demselben Enzym voneinander getrennt werden aufgrund deren verschiedener isoelektrischer Punkte. Dem Gel wurden dazu Ampholyte (Fa. Serva, Ampholine pH 3-10) zugesetzt, durch die bei Anlegung der elektrischen Spannung ein stabiler pH-Gradient aufgebaut wird. Dabei sollte die Stärke des elektrischen Feldes so gewählt werden, daß sich der pH-Gradient über die maximale Länge des Gels ausbildet, wodurch nahe beieinander liegende isoelektrische Punkte von Enzymen optimal voneinander getrennt wurden. Zur Überprüfung des Gradientenaufbaus wurde stets ein nicht mit Proben belegter Gelstreifen abgetrennt und auf seine ganze Länge mit pH-Teststreifen untersucht, welche ca. 5-10 min aufgelegt wurden. Ein optimaler Gellauf und damit eine exakte Probenaufftrennung zeigte sich in einer linear ansteigenden pH-Wert-Laufspur von pH 3-10. Mit der mit Proben belegten Enzymmatrix wurde anschließend eine Aktivitätsfärbung durchgeführt, die für jedes Enzym spezifisch war. Das Enzymmuster bleibt als einzelne Banden nur solange im Gel sichtbar wie eine Stabilität des Gradienten gegeben ist.

#### Zusammensetzung der Gelmatrix:

- 18,5 ml A. dest.
- + 7,0 ml Glycerol (87 %)
- + 30 g Harnstoff
- + 200 µl Triton X-100
- + 10 ml Acrylamid (30 % Polyacrylamid + 1,6 % N, N'-Methylenbisacrylamid)
- + 3000 µl Ampholine (pH 3-10, Servalyt AG 3-10)
- ⇒ Die Substanzen wurden zusammengefügt und vollständig evakuiert zwecks Vermeidung etwaiger Lufteinschlüsse im Gel.
- + 200 µl N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- + 250 µl Ammoniumperoxodisulfat (10 % APS)

Das Gel wurde sofort gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation bei Raumtemperatur ruhig stengelassen. Für ein schnelleres Polymerisieren konnte entweder Kaliumpersulfat (1 %) oder Riboflavin (0,015 %) zugesetzt werden. Erstere Substanz beschleunigt die Gelerhärtung bei direkter Wärmezufuhr (20-25 °C), letztere bewirkt dasselbe während ca. 20 min Bestrahlung des Gels mit einer Fluoreszenzlampe (UV-Licht).

#### Anodenpuffer:

- 50 mM NaOH

#### Kathodenpuffer:

- 25 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Lysepuffer im Verhältnis 1:1 versetzt.

#### Lysepuffer:

- 0,4 g Harnstoff
- + 200 µl Triton X-100 (10 %, v/v)
- + 20 µl Ampholine 3-10
- + 10 µl 2-Mercapthoethanol
- + 450 µl A. dest.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit einer IEF-Apparatur der Fa. Pharmacia (Typ Multiphor II). Damit konnte ein Gel der Größe 10 x 24,5 cm gegossen werden. Bei dem zum Einsatz gekommenen Netzgerät handelte es sich um den Typ 2197 Power Supply (Fa. LKB Bromma). Vor dem Lauf wurde die Gel-Kühlplatte auf die optimale Lauftemperatur von 10 °C mit Hilfe eines Kälte-Umwälzthermostaten (Fa. Julabo, Typ F 25-MP) heruntergekühlt. Die Fokussierung erfolgte unter folgenden Bedingungen: 50 mA, 30 W, 1,5 h. Nach dem Lauf wurden in den Gelen durch spezifische Aktivitätsfärbung die Enzymformen nachgewiesen.

#### 2.18.2.1 Aktivitätsnachweis von Glutathionreduktase

Die Glutathionreduktase wurde im Gel nach einer Methode von Kaplan et al. (1968) angefärbt. Die Matrix wurde zu diesem Zweck in die Färbelösung bei 37 °C und unter Lichtausschluß solange inkubiert, bis rote Banden auf einem blauen Hintergrund sichtbar wurden. Wenn diese eine ausreichende Intensität erreichten, wurde das Gel mit einer 1 M HCl-Lösung gegengefärbt, um die blaue Colourierung zu entfernen und die GR-Banden

deutlicher hervorzuheben. Anschließend wurde das Gel in A. dest. gewaschen und in 50 % EtOH fixiert.

Färbelösung:

- 20 ml 0,25 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,4)
- + 40 mg GSSG
- + 10 mg NADPH
- + 0,2 mg DCIP (2,6-Dichlorophenol indophenol)
- + 10 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid)

### **2.18.2.2 Aktivitätsnachweis von Glutathion-S-transferase**

Der Glutathion-S-transferase-Aktivitätsnachweis wurde als Farbreaktion in Anlehnung an die Methode nach Clark (1982) und Ricci et al. (1984) durchgeführt. Das Gel wurde dazu in Färbelösung A bei 37 °C 10 min unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert und anschließend in A. dest. gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur in Lösung B. Eine Färbung, hervorgerufen durch blaues unlösliches Formazan, erschien innerhalb von 3-5 min auf der Geloberfläche, ausgenommen in den GT-Regionen. Eine Waschung mit A. dest. und folgend eine Inkubation in einer 1 M NaCl wurde durchgeführt. Unter diesen Bedingungen blieben die farblosen Banden deutlich sichtbar für längere Zeit erhalten.

Färbelösung A:

- 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5)
- + 4,5 mM GSH
- + 1 mM CDNB
- + 1 mM NBT

Färbelösung B:

- 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,6)
- + 3 mM Phenanzinmethosulfat (PMS, Elektronenakzeptor)

Insbesondere Lösung B sollte erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden, da sie zur Autoxidation neigt. Nachstehend eine weitere, angewandte Färbemethode für GT-Aktivität. Hierbei wurde ein mit Lösung C getränktes Filterpapier auf die Oberfläche des Polyacrylamid-Gels gelegt, welches zusätzlich 0,04 % (w/v) lösliche Stärke enthielt. Dabei sollte man die Bildung von Lufteinschlüssen zwischen Papier und Gel vermeiden. Anschließend wurde beides bei 37 °C 40 min inkubiert und danach das Filterpapier entfernt. Lösung D und E wurden gemischt und über das Gel gegossen. Eine intensiv blaue Färbung erschien sofort in Regionen, wo reduziertes Glutathion mit CDNB mittels GT konjugierte.

Färbelösung C:

- 20 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,5)
- + 8 mg CDNB
- + 14 mg GSH

CDNB wurde in 0,8 ml EtOH vorgelöst.

Färbelösung D:

- 0,9 ml 1 % J<sub>2</sub> in 1 % KJ
- + 30 ml A. dest.

Färbelösung E:

- 30 ml 2 % Agarlösung (60 °C)

## 2.19 Lokalisation von Enzymen außerhalb des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Metabolismus

Tissue Printing ist unter anderem eine Technik für die Detektion von Enzymen und ihrer Verteilung im Gewebe. Es wird zur Auffindung von RNA und Proteinen durch Einsatz von spezifischen Antikörpern oder für enzymatische Aktivitäten genutzt. Der Prozeß des Abdrucks (= Blotten) basiert auf der ursprünglichen Technik von Jung et al. (1992), modifiziert nach Avdiushko et al. (1993,1994). Mit Induktor (1 % *R. sachalinensis*-Extrakt, 500 µM Bion) besprühte Gurkenblätter wurden 24 h danach für 30 s in 70 % Ethanol getaucht; bei in Induktorlösung eingetauchten Blättern (Inkubation für 24 h) folgte keine derartige Alkoholbehandlung. Die untere Epidermis wurde mit Quarz- oder Seesand zur Erhöhung der Effektivität des Transfers der Proteine auf die Membran entfernt. Nach Abspülung des Sands mit A. dest. und Trocknung der Blattfläche wurden die Blätter mit der Unterseite auf eine Nitrocellulosemembran plziert, die zuvor 10 min in einer 100 mM Natriumphosphatpuffer gewässert und zwischen zwei Lagen Filterpapier gelagert wurde, und für 5 min einem konstanten, manuell ausgeführten Druck ausgesetzt. Die zu detektierenden Proteine (Enzyme) übertrugen sich dabei auf die Membran und wurden anschließend spezifisch für jedes Enzym in Anlehnung an die Methode nach Spruce et al. (1987) angefärbt. Dazu erfolgte eine 4 h Inkubation in der entsprechenden Substratflüssigkeit und anschließender Behandlung der Membran mit einer Färbelösung für 4 min zum Sichtbarmachen der Enzymaktivität. In Vorversuchen wurden nur Dot-Blots mit API-ZYM-Proben angesetzt. Nach Ausarbeitung der Methodik und der geeigneten Konzentrationen wurden ganze Gurkenblätter eingesetzt, die 24 h in *R. sachalinensis*-Extrakt oder Bion inkubiert worden waren.

### 2.19.1 Nachweis von Glucosidase-Aktivität

Eine Aktivitätsfärbung für β-Glucosidase erfolgte durch Inkubation des Gewebeabdrucks im Substrat 4-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid (3 mg/ml A. dest.) mit anschließender Behandlung in einer Fast Blue B Salz-Lösung (1 mg/ml). Durch die Verwendung des sehr spezifischen Substrats wurde Glucosidase blau angefärbt.

### 2.19.2 Nachweis von Galactosidase-Aktivität

Zur Anfärbung von  $\beta$ -Galactosidase wurde das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) (3 mg/ml A. dest.) eingesetzt. Die Aktivität wurde ebenfalls mit einer Fast Blue B Salz-Lösung sichtbar gemacht. Galactosidase wurde dabei violett gekennzeichnet.

### 2.20 Licht- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Der Infektionsprozeß an von Konidien (*S. fuliginea* oder *B. graminis* f. sp. *hordei*) attackierten Epidermiszellen wurde licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Diaplan Fa. Leitz, Axioskop Fa. Zeiss). Papillenstrukturen und Zellen, die eine Hypersensitive Reaktion (HR) durchlaufen hatten, wurden mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Diese Strukturen zeigten bei einer Blaulichtanregung eine gelbe Autofluoreszenz (485 nm; Koga et al. 1988, Mayama & Shishiyama 1978).

#### 2.20.1 Färbung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Das Ablaufen oxidativer Prozesse in invadiertem Gewebe wurde durch den Einsatz von DAB untersucht. Bei neutralem pH und in Abwesenheit von extern appliziertem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert DAB bei natürlichem Auftreten von Peroxidase im pflanzlichen Gewebe zu einem unlöslichen, braun gefärbten Produkt. Das rotbraune DAB-Polymer ist hochstabil und unlöslich. Da Zellen DAB in Lösung aufnehmen, ist eine *in vivo*- und *in situ*-Detektion des relativ kurzlebigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf zellulärer Ebene möglich (Thordal-Christensen 1997). DAB gelangte bei Gersten- und Gurkenprimärblättern durch Inkubation oder Infiltration in das Blattgewebe, bei Gerstenkoleoptilen nur durch Inkubation.

#### 2.20.2 Präparation der Gerstenkoleoptilen

Die Koleoptile, Keimblatt und Keimscheide der *Poaceen*, umschließt das Primärblatt schützend, bis der Keimling die Bodenoberfläche durchbrochen hat, und wird dann vom Primärblatt durchstoßen. Die Koleoptile besteht aus einer inneren, dem Sämling bzw. Stengel anliegende, und einer äußeren Epidermis. Das dazwischenliegende Mesophyll wird wenige Tage nach der Keimung autolysiert. Dadurch ist es möglich, die innere Epidermis als eine lebende Einzellschicht zu präparieren, mit einem Pathogen zu inokulieren und mehrere Tage vital zu erhalten. Die Methode der Koleoptilenpräparation nach Bushnell (1967) bietet die Möglichkeit, Wirts- sowie Pilzstrukturen in Interaktion zu mikroskopieren. Dazu wurden die Koleoptilen von ca. sieben Tage alten, mit den verschiedenen Induktoren (1% *R. sachalinensis*-Extrakt, 100 ppm Endkonzentration DCSA) behandelten Gerstenpflanzen entnommen, wenn das Primärblatt über der Koleoptilenspitze eine Länge von ca. 10 cm und die Koleoptile selbst eine Länge von etwa 1,5-2 cm aufwies. Die Pflanze wurde dabei direkt über der Erde abgetrennt, die weitere Präparation erfolgte unter einem Binokular (Skizze s. Moch 2000). Die der Spitze abgewandte Seite der Koleoptile wurde längs aufgeschnitten, so



daß die beiden Leitbündel an dem zu präparierenden Stück verblieben. Dies gewährleistete eine weitere Versorgung der Epidermis. Die restliche Koleoptile wurde abgehoben und auf einem Objekträger fixiert (Gewebeband). Die äußere Epidermis wurde in Form eines Fensters (0,3 x 1 cm) entfernt. Die Koleoptile wurde dann mit der präparierten Seite in eine Nährlösung (10 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) gesetzt. Zu beachten war, daß die Oberfläche der inneren Epidermis der Koleoptile nicht mit der Flüssigkeit benetzt wurde, um eine Schädigung der Mehltaukonidien zu vermeiden. Wurden die Koleoptilen länger als zwei Tage aufbewahrt, ist der Nährlösung Saccharose (10 mM) zugesetzt worden. Die Koleoptilen wurden im Inokulationsturm mit einer Sporendichte von 5-15 Konidien/mm<sup>2</sup> künstlich infiziert und anschließend auf eine frische Nährlösung umgesetzt. Die Behältnisse wurden offen in den Lichtthermostaten der Gerstenpathogennachzucht aufgestellt, um Kondenswassertropfen zu vermeiden. Zum Nachweis von Wasserstoffperoxid wurde in die Nährlösung der Koleoptilen 4-6 h vor dem Mikroskopieren DAB (0,5 mg/ml DMSO) hinzugegeben.

### 2.20.3 Vorbereitung der Gersten- und Gurkenprimärblätter

In Koleoptilen können eventuell bestimmte Reaktionen nicht beobachtet werden, da es um ein reduziertes pflanzliches System handelt. Deswegen wurden zusätzlich Gerstenprimärblätter verwendet, die zum Zeitpunkt der Sprühapplikation des Induktors voll entfaltet waren. Neben den schon erwähnten Induktoren wurde hier Bion (5000 µM) eingesetzt. Desweiteren wurde der *Reynoutria*-Extrakt zusätzlich in einer leicht modifizierten Variante angewendet. Diese Modifikation (*R. s.<sub>mod.</sub>*) beinhaltetete das Entfernen des Extraktbelages kurz vor der Inokulation, um die mögliche direkte Wirkung des Induktors auszuschalten. Die Inokulation der Gerstenblätter (Oberseite) erfolgte an ganzen Pflanzen. Dabei wurden diese in eine horizontale Lage gebracht, um eine gleichmäßige Infektion zu gewährleisten. Die Inokulationsdichte betrug 10-25 Konidien/mm<sup>2</sup>.

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anfärbung wurde 24, 48 und 72 h nach Inokulation durchgeführt, indem 3 cm lange Blattstücke 1 cm unterhalb der Blattspitze herausgeschnitten und 8 h bei Licht in DAB-Lösung inkubiert wurden (vgl. Kapitel 2.8.4). Die Entfärbung der Blattstücke wurde, wie unter Kapitel 2.8.5 beschrieben, durchgeführt. Bei den parallel verlaufenden Untersuchungen mit Gurkenpflanzen wurde registriert, welche Infektionsstadien von *S. fuliginea* in zuvor mit Extrakt (1 % *R. sachalinensis*, *R. s.<sub>mod.</sub>*) oder Bion (5000 µM) induziertem Gurkengewebe gehemmt werden bzw. sich abnormal verhalten. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Anfärbung geschah ein bis sieben Tage nach Inokulation.

### 2.20.4 Anfärbung der Mehltaupilze

#### 2.20.4.1 Anfärbung der Pilzstrukturen mit Blue Ink

Um die Pilzstrukturen für die Lichtmikroskopie anzufärben, wurden die Gerstenblattstücke bzw. die Gurkenblattscheiben 30 s in 10 % Blue Ink (v/v; Fa. Pelikan, Germany) eingetaucht, die in 25 % Essigsäure gelöst worden war. Durch mehrmaliges Spülen des Blattmaterials mit A. dest. wurde anschließend überschüssiger Farbstoff entfernt (Kogel et al. 1994).

#### **2.20.4.2 Anfärbung der Pilzstrukturen mit Lactophenol-Trypanblau**

Inokuliertes Blattmaterial von Gerste oder Gurke wurde 1 min in ein heißes Lactophenol-Trypanblau-Gemisch gegeben und anschließend mit einer Chloralhydratlösung entfärbt. Pilzstrukturen wurden dadurch dunkelblau markiert, umliegendes Wirtsgewebe war farblos (Koch, Siegrist, pers. Mitteilungen).

Chloralhydratlösung:

- 25 g Chloralhydrat
- + 10 ml A. dest.

Lactophenol-Trypanblau-Gemisch:

- 10 g Phenol
- + 0,02 g Trypanblau
- + 10 ml Glycerin
- + 10 ml Milchsäure
- + 10 ml A. dest.

#### **2.20.4.3 Anfärbung der Pilzstrukturen mit Coomassie Brilliant Blau**

Mit Mehltau inokulierten Blättern von Gerste oder Gurke wurden mit einer Entfärbelösung (s. Kapitel 2.8.5) das Chlorophyll entzogen. Dann wurden diese Blätter mit einer Coomassie Brilliant Blau-Lösung angefärbt. Pilzstrukturen (Konidien, Keimschläuche und Haustorien) wurden damit blau-violett markiert.

Coomassie Brilliant Blau-Lösung:

- 0,6 % Coomassie Brilliant Blau R 250 (w/v)
- + 50 ml 99 % Methanol (v/v)
- + 50 ml 15 % Trichloressigsäure (w/v)

#### **2.20.5 Mikroskopie und Auswertung der Koleoptilen und Primärblätter**

Beim Mikroskopieren wurden die Koleoptilen an beiden Enden vorsichtig befestigt und flachgedrückt. Die Untersuchungen wurden 24, 48 und 72 h nach Inokulation durchgeführt. Zur näheren Beobachtung des Infektionsprozesses wurden einzelne Koleoptilen 8, 16 und 20 h nach Inokulation mikroskopiert. Ermittelt wurde die Keimrate (gekeimte Konidien:ungekeimte Konidien), wobei eine gekeimte Konidie mindestens einen primären Keimschlauch haben mußte. Desweiteren wurden gekeimte Konidien mit appressorialem Keimschlauch gezählt, bei denen noch folgende Kriterien unterschieden wurden:

- Bildung einer effektiven Papille ( $\pm$  DAB-Färbung der Papille) als Merkmal einer erfolgreichen Pathogenabwehr;
- Bildung eines Haustoriums ohne Papille, eines Haustoriums in Kombination mit einer Papille, sekundärer Hyphen als Merkmale für eine erfolgreiche Infektion;
- Bildung gekeimter Konidien ohne sichtbare Zellantwort, d. h. kein Haustorium und keine Penetrationsversuche.

Beim Mikroskopieren der Gerstenprimärblätter wurden pro Blattstück jeweils 50 Infektionsstellen betrachtet, d. h. Konidien, die mindestens den appressorialen Keimschlauch gebildet hatten. Es wurden dabei nur solche Infektionsstellen ausgezählt, bei denen eine Epidermiszelle von maximal einer Konidie attackiert wurde. Die Akkumulation mehrerer Konidien an ein und derselben Zelle führt zu einer gegenseitigen Beeinflussung und hätte so das Bild verfälscht. Allgemein wurden nur die kurzen Epidermiszellen der Blattoberseite untersucht (Typ A und Typ B; Koga et al. 1990). Die Nebenzellen der Schließzellen wurden ebenfalls ausgelassen. Die Beobachtungskriterien entsprachen denen des Koleoptilen-systems, zusätzlich wurde als erfolgreiche Pathogenabwehr die Bildung einer HR  $\pm$  DAB festgehalten. Zur Auswertung der mikroskopischen Untersuchungen an Gurkenpflanzen wurden drei Kategorien aufgestellt, die unterschiedliche Parameter enthielten:

- I) erfolgreiche Pathogenabwehr (effektive Papillenbildung  $\pm$  DAB, HR  $\pm$  DAB, Kombination effektive Papille + HR );
- II) erfolgreiche Infektion (Haustorienbildung  $\pm$  DAB, Haustorienbildung  $\pm$  Papille, sekundäre Hyphenbildung);
- III) Rest (ohne spezifische Zellantwort, d. h. gekeimte Konidien ohne Weiterentwicklung).

## **2.21 Cytologische Untersuchungen**

### **2.21.1 Nachweis von Zelltod**

Zum Nachweis toter Zellen wurden zwei verschiedene Fluorochrome eingesetzt, Trypanblau und Evans Blue. Beide Substanzen dienen der Färbung für Hellfeld- und Fluoreszenzmikroskopie.

#### **2.21.1.1 Färbung mit Trypan Blau und Evans Blue**

Reines Trypanblau zeigt keine Fluoreszenz, doch wenn es an Proteine gebunden vorliegt, fluoresziert es rot. Auf diese Art ist freies Trypanblau, welches im Fluoreszenzlicht unsichtbar bleibt, von der gebundenen Form zu unterscheiden. Evans Blue wird besonders in Pflanzengewebe für die Anfärbung toter Zellen eingesetzt (Gaff & Okong'O-Ogola 1971). Es wird von lebenden Zellen an deren intakten Plasmamembranen ausgeschlossen. Die Untersuchungen beinhalteten sowohl eine Inkubation ganzer Gewebe als auch eine punktförmig gesetzte Sprühapplikation des *R. sachalinensis*-Extrakts (1 %) bzw. von externem Wasserstoffperoxid (2000 ppm). Der Farbstoff Evans Blue (0,5 %, w/v) wurde anschließend in das Blattgewebe infiltriert. Überschüssiges Reagenz wurde durch mehrmaliges Wässern in A. dest. entfernt. Mit dem Farbstoff Trypan Blau (s. Kapitel 2.20.4.2) wurde gleichermaßen verfahren.

#### **2.21.1.2 Quantifizierung toter Zellen**

Zur quantitativen Bestimmung des Verhältnisses von totem zu vitalem Zellgewebe wurde die photometrische Methode nach Levine et al. (1994) und Shirasu et al. (1997) leicht modifiziert. Dabei wurden zuvor behandelte Gurkenblätter (1 % *R. sachalinensis*-Extrakt,

2000 ppm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in einer 0,05-0,5 % Evans Blue-Lösung inkubiert bzw. der Farbstoff in das Gewebe infiltriert. Anschließend wurde ungebundenes Evans Blue mit A. dest. ausgewaschen. Die an tote Pflanzenzellen gebundene chromogene Substanz wurde durch eine 30 min Inkubation in einer Entfärbelösung im Wasserbad (50 °C) herausgelöst und im Photometer bei 600 nm quantitativ erfaßt.

Entfärbelösung:

- 50 % Methanol
- + 1 % Dodecylsulfat-Natriumsalz

### 2.21.2 Vitalfärbung

Zur Färbung vitaler Zellen und Gewebe wurden die wasserlöslichen Anilinfarben Methylenblau und Neutralrot verwendet. Beide Farbstoffe wurden in isotonischer Lösung (Verdünnung 1:100000) angesetzt. Methylenblau zeigt cytologisch eine intensive blaue Colorierung auf mehr oder weniger farblosem Untergrund. Das basische Neutralrot liefert rötliche Farbtöne (Böck 1989). Die Substanzen wurden entweder durch Inkubation von Blättern in der Färbelösung oder durch Infiltration von Blattstücken oder Auftragen auf ganze Blätter angewendet.

## 2.22 Beteiligung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe an der Induzierten Resistenz

Zur Beantwortung der Frage, ob und wie weit sekundäre Pflanzenstoffe an der induzierenden Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts beteiligt sind, wurde die Gruppe der Phenole untersucht.

### 2.22.1 Nachweis von phenolischen Verbindungen

Die histochemische Färbung von oligomeren Proanthocyanidinen und monomerem Catechin wurde mit dem selektiven Flavanol-Reagenz 4-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) durchgeführt (McMurrough & McDowell 1978). Dazu wurde in Anlehnung an die Methode von Schwalb & Feucht (1998) folgendermaßen verfahren: Gurkenpflanzen, die mit Induktor (1 % *R. sachalinensis*-Extrakt, 1000 ppm Bion, 2 % Phycion) behandelt und z. T. drei Tage später mit *S. fuliginea* inokuliert worden waren, wurden 48 h und 96 h nach der letzten Behandlung beprobt. Die ausgestanzten Blattscheiben bzw. ganze Blätter wurden in der DMAZA-Färbelösung vorsichtig aufgekocht. Je nach Zustand des Blattmaterials variierte die Aufkochzeit zwischen 30 s und 2 min. Nach Auslegen des Blattgewebes auf einen Glaträger entwickelte sich bei Anwesenheit von Flavanolen innerhalb 3 min eine blaue, irreversible Färbung. DMAZA, das keine Komplexbildung eingegangen war, färbte das Blattmaterial gelb. Nach ca. 20 min wurde das Gewebe mit A. dest. und EtOH abgewaschen, um überschüssiges Farbreagenz (gelb) zu entfernen. Anschließend erfolgte die mikroskopische Untersuchung im Durchlicht.

Färbelösung:

- 20 ml 1 % DMAZA (v/v)
- + 80 ml 6 n Butanol/HCl (v/v)

## **2.23 Sonstige Einflüsse auf die Ausbildung der Induzierten Resistenz**

### **2.23.1 Keimfähigkeit und Keimverzögerung von *S. fuliginea*-Sporen**

Die antifungale Aktivität von verschiedenen Pflanzenextrakten wurde schon von vielen Autoren beschrieben (Karade & Sawant 1999). Diese führt in den meisten Fällen zu einer direkten Keimhemmung, die je nach Konzentration des Pflanzenextrakts bis zu 100 % betragen kann. Rohextrakte verhalten sich dabei in der Regel anders als mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelte Fraktionen. Registriert wurden die prozentualen Keimraten zweier Mehltaurassen (AG Schmitt, Darmstadt, AG Konstantinidou-Doltsinis, Patras) 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach erfolgter Inokulation. Dabei wurde die Wirkung eines 0,5 % und 1 % *R. sachalinensis*-Extrakts, einer Bionbehandlung (500 µM) und von Phycion (2 ppm) getestet. Die Konidien wurden mit einem Tesastreifen von der Blattoberfläche abgehoben, und dieser mit der belegten Seite nach oben auf einem Objektträger fixiert. Pilzstrukturen, die bei einer normal verlaufenden Mehltauinfektion im Blattgewebe zu finden sind, konnten mit dieser Methode nicht verfolgt werden. Es wurden lediglich gekeimte von ungekeimten Konidien unterschieden, indem insgesamt pro Wiederholung 100 Konidien ausgezählt wurden.

### **2.23.2 Messungen des pH-Milieus auf Blattoberflächen**

Der Oberflächen-pH wurde unter Standardbedingungen mit einer Glas-Flachbodenelektrode (Fa. Orion) gemessen, in Anlehnung an Oertli et al. (1977). Die behandelten Pflanzen befanden sich bis zum Zeitpunkt der Messung und währenddessen in einer Plexiglaskammer mit 100 % Luftfeuchtigkeit. Zu beachten war, daß sich weder ein Lufteinschluß zwischen Elektrode und Blatt befand, noch daß das Blatt durch die Meßkette beschädigt wurde, da jede Wundreaktion den pH-Wert beeinflusste.

## **2.24 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Programme EXCEL 2000 und Statistica Stat Soft Inc durchgeführt. Die Meßwerte wurden auf Normalverteilung geprüft (Lilliefors-Wert > 0,20). Um sowohl Varianten im Zeitverlauf als auch Varianten untereinander zu vergleichen, wurde bei Normalverteilung der t-Test (Student) angewendet (Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ ). Entsprachen die Werte keiner Normalverteilung, wurden die Daten mit nichtparametrischen Methoden bearbeitet. Zu deren Prüfung wurde der Rangsummentest sowie der Kruskal-Wallis-Test herangezogen (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %). Die Auswertung der übrigen Biotests erfolgte durch Konfidenzintervallschätzung, die den wahren Mittelwert  $\mu$  der Grundgesamtheit mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 % enthält (t-Tabelle nach Student).

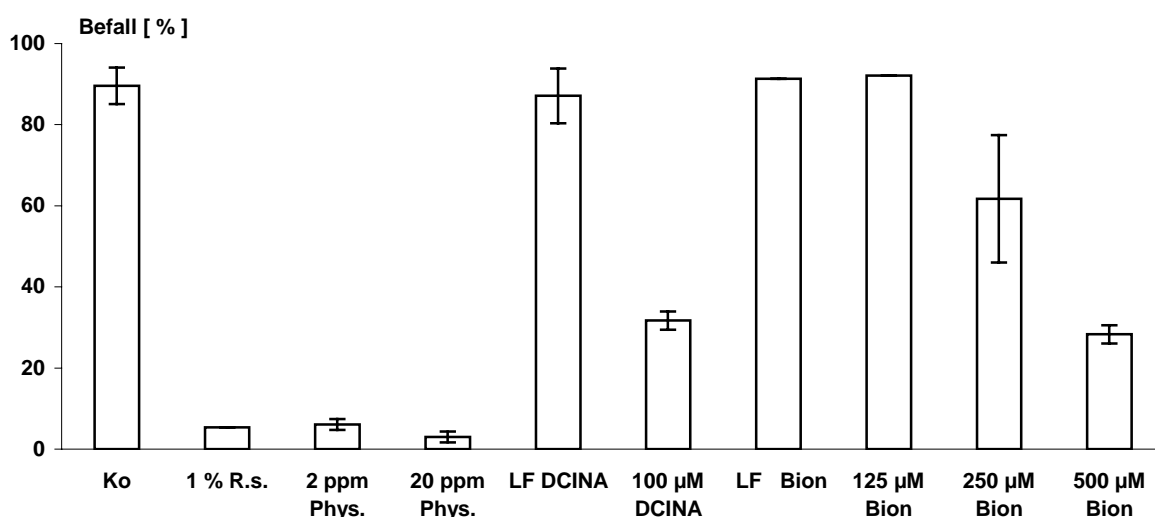
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Reaktionen der Wirtspflanzen auf den Einsatz von Induktoren

Die Wirksamkeit verschiedener Resistenzinduktoren wurde an zwei unterschiedlichen Wirt-Pathogen-Systemen geprüft. Dabei handelte es sich um die Kombination Gurke (*Cucumis sativus*) der Sorte "Chinesische Schlange" / Echter Gurkenmehltau (*Sphaerotheca fuliginea*) und Gerste (*Hordeum vulgare*) der Sorte "Igri" / Echter Gerstenmehltau (*Blumeria* [syn. *Erysiphe*] *graminis* f. sp. *hordei*).

##### 3.1.1 System *Cucumis sativus* / *Sphaerotheca fuliginea*

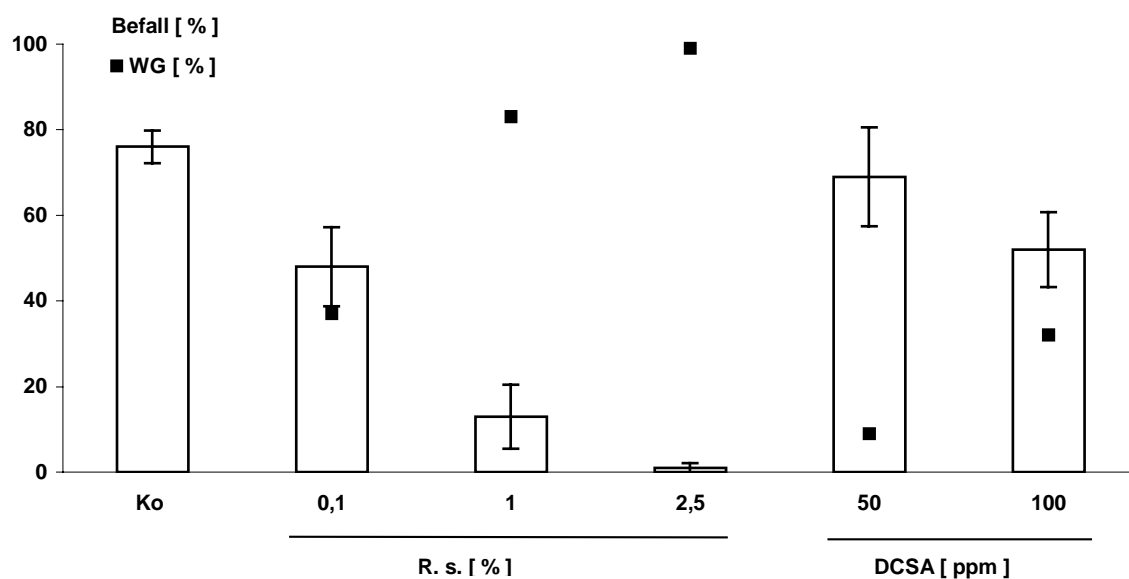
Bei diesen Biotests wurde eine Inokulumdichte von ca.  $5 \times 10^4$  Konidien / ml verwendet, da sich bei dieser Sporenkonzentration ein gut zu differenzierender Mehltaubefall entwickelte. Ein 1 % wäßriger Auszug von *R. sachalinensis* reduzierte den Befall auf 5,4 % (Abbildung 1). Die bis zu diesem Zeitpunkt einzige identifizierte Wirkkomponente des Knöterichextrakts Physcion (Schmitt et al. 1998) ergab bei äquivalent zum Gesamtextrakt angewandeter Konzentration (2 ppm) eine vergleichbar hohe Einschränkung des Pathogenbefalls. Sprühapplikation von 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) in der Konzentration 100 µM zeigte dagegen noch eine Befallsstärke von 31,7 % (Leerformulierung ohne DCINA gleich unbehandelter Kontrolle), während die zehnfach erhöhte Dosis phytotoxische Effekte zur Folge hatte. Eine Gießapplikation von DCINA, wie sie in einigen Pathosystemen angewendet wird, erwies sich nicht als bessere Anwendungstechnik hinsichtlich des zu erzielenden WG (Daten nicht gezeigt). Als weiterer synthetischer Induktor wurde Benzothiadiazol (BTH, BION, Fa. Novartis, Basel) eingesetzt, dessen Wirkung gegen *S. fuliginea* linear dosisabhängig (125 µM, 250 µM, 500 µM) war. Die Leerformulierung hatte keinen Einfluß. Höher dosierte Bion-Applikationen wirkten phytotoxisch (ohne Abbildung).



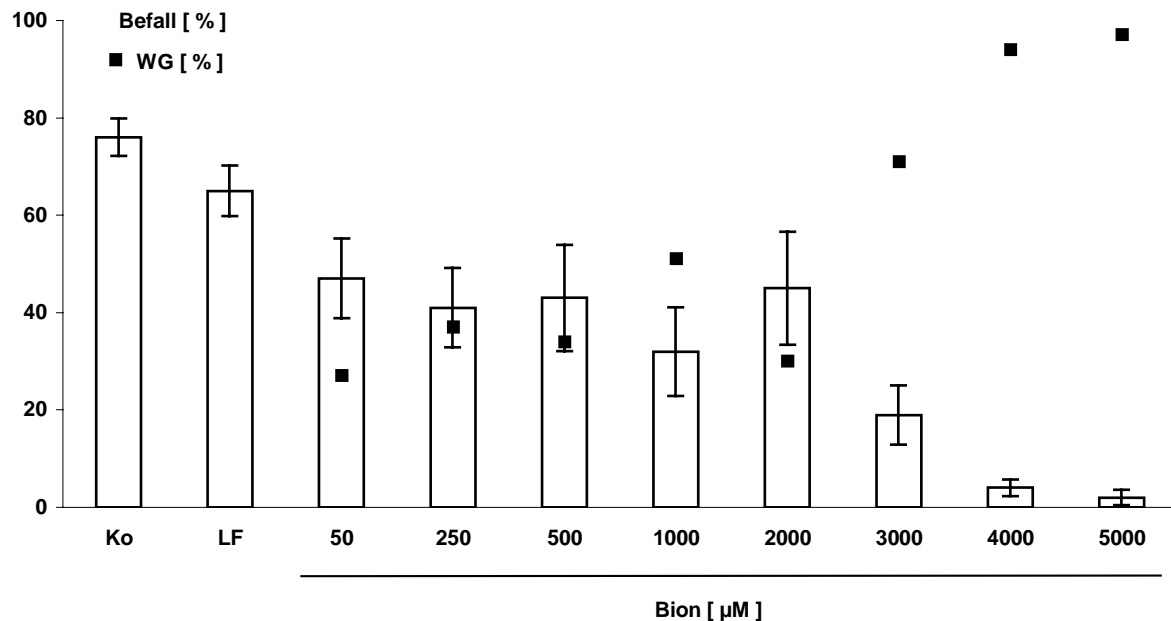
**Abb. 1:** Einfluß protektiver Induktorapplikationen (Phys. = Physcion, R.s. = *Reynoutria sachalinensis*, DCINA = Dichlorisonicotinsäure, LF = Leerformulierung) auf den Befall von Gurken mit *Sphaerotheca fuliginea* (n = 12).

### 3.1.2 System *Hordeum vulgare* / *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Der Wirkungsgrad in diesem Wirt-Pathogen-System ergab sich durch die prozentuale Befallsschätzung der mit Mehltaupusteln belegten Blattstücke, die auf Wasseragar ausgelegt und durch Trockeninokulation infiziert waren. Das Zeitintervall zwischen Inokulation und Befallserhebung wurde auf sieben Tage festgelegt. Es wurde die susceptible Wintergerstensorte "Igri" verwendet. Die Kontrolle zeigte sieben Tage nach Inokulation einen durchschnittlichen Befallsgrad von 76,5 %. Mit 0,1 % *R. sachalinensis*-Extrakt behandelte Pflanzen wiesen einen Befall von 47,9 % und einen Wirkungsgrad von 37,4 % auf, nach Behandlung mit einem 1 % Extrakt einen Befall von 12,7 %, was einem WG von 83,4 % entsprach. Sprühapplikation eines 2,5 % Extrakts unterdrückte den Befall durch Mehltau fast ganz (Befall = 1,33 %, WG = 98,3 %), (Abbildung 2). Die Wirkung des *Reynoutria*-Extrakts erwies sich auch bei Sprühapplikation kurz vor Inokulation als hoch (Befall = 20,6 %, WG = 59,6 %). Die modifizierte *Reynoutria*-Variante, bei der der Extrakt auf den Blättern vor Inokulation durch Abwaschen entfernt wurde, zeigte einen WG von 36,8 % (ohne Abbildung). Dieser war dem der mit 100 ppm DCSA behandelten Variante (WG = 31,5 %) vergleichbar. Blattstücke von Gerstenpflanzen, die mit 50 ppm DCSA behandelt waren, hatten einen WG von 9,9 % bei einem Befall von 68,9 %.



**Abb. 2:** Einfluß protektiver Spritzapplikation (R.s. = *Reynoutria sachalinensis*) und Gießapplikation (DCSA = Dichlorsalicylsäure) auf den Befall von Gerste (Igri) mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (n = 14).



**Abb. 3:** Einfluß protektiver Spritzapplikation von Bion in verschiedenen Konzentrationen auf den Befall von Gerste (Igri) mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (n = 14).

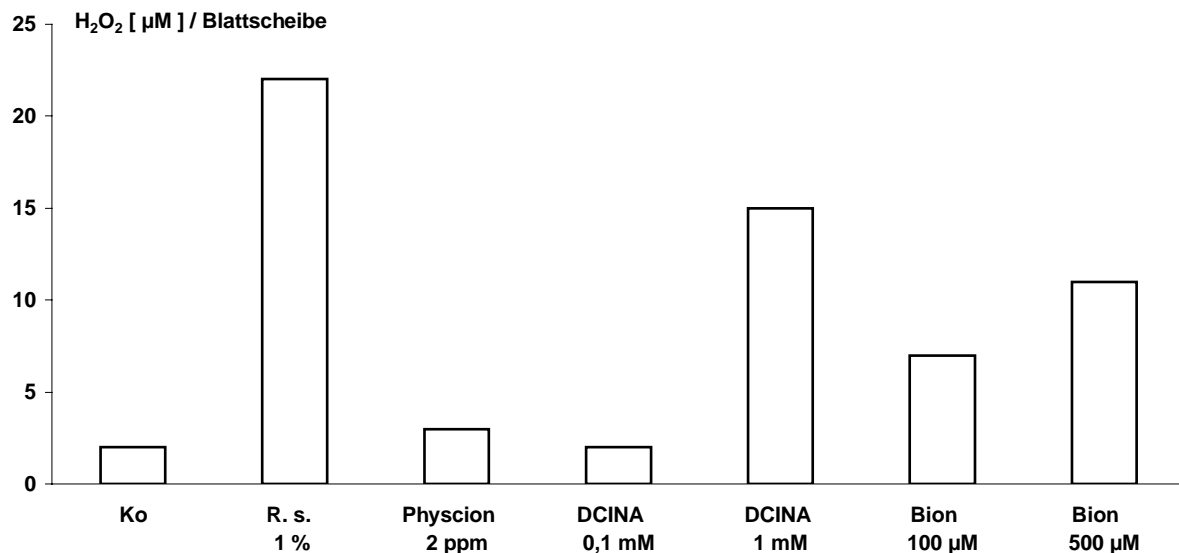
Für die mit Bion in unterschiedlichen Konzentrationen behandelten Varianten diente die Bion-Leerformulierung als Kontrolle. Die Bion-Varianten zeigten bis 2000 µM einen relativ geringen durchschnittlichen WG von ca. 30 %, in Ausnahmen 50 %. Erst bei höheren Konzentrationen (3000 µM: WG = 71 %; 4000 µM: WG = 94 % und 5000 µM: 97 %) konnte ein sehr geringer Befall registriert werden (Abbildung 3).

### 3.2 Beteiligung von O-Radikalen an der Induzierten Resistenz

#### 3.2.1 Quantifizierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Induktorbehandlung

Es wurde postuliert, daß die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eine Bedeutung bei der Resistenzinduktion durch *R. sachalinensis* hat. In vielen Systemen konnte schon eine Steigerung der ROS-Gehalte innerhalb von Sekunden bis Minuten nach einer Behandlung mit einem Elicitor, Pathogen oder Induktor detektiert werden (Alvarez & Lamb 1997). Die Höhe und der zeitliche Verlauf der gesteigerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (oxidativer Burst) variierten dabei sehr stark. In vielen induzierten Wirt-Pathogen-Systemen wurde davon ausgegangen, daß zwei getrennt voneinander auftretende oxidative Bursts vorliegen können. In den eigenen Untersuchungen wurde das nach Induktorbehandlung mit oder ohne Pathogenbefall von der Pflanze gebildete und extrazellulär abgegebene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfaßt. Um auf die wirklich produzierte Menge zu schließen, wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge auf die apoplastische Phase des pflanzenspezifischen Gewebes bezogen, so daß Gurken- und Gerstenpflanzen miteinander verglichen werden konnten.





**Abb. 4:** Wasserstoffperoxidbildung in Gurkenblättern nach 6stündiger Inkubation in verschiedenen Resistenzinduktorlösungen (n = 6).

Es wurden die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen nach Induktorbehandlung ohne Pathogenbefall erfaßt, die mittels einer Eichreihe quantifiziert werden konnten (Abbildung 4). Der 1 % Extrakt aus *R. sachalinensis* erzeugte eine im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle (2 µM) um das Zehnfache erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge (22 µM) nach 6 h Inkubation der Gurkenblattscheiben. Die Untersuchung eines 5 % Extrakts, der in der Regel im Gewächshaus nicht praxisrelevant war, induzierte eine weit über dem linearen Eichbereich liegende hinaus hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge (> 30 µM und < 70 µM). Eine exakte Quantifizierung war deswegen nicht möglich. Inkubation in DCINA-Lösungen verstärkte ebenfalls die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion, wobei ebenso wie bei *R. sachalinensis* eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet werden konnte. Behandlung mit 1 mM DCINA induzierte eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge von 15 µM, ebenso Bion. Hier wurde eine maximale Bildungsrate von 11 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM Bion) erreicht. Verstärkte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Physcion-Behandlung konnte nicht nachgewiesen werden, wobei aufgrund der fehlenden Verträglichkeit des Lösungsmittels EtOH mit dem Testsystem höhere Konzentrationen von Physcion nicht getestet werden konnten. Da in der Literatur in diversen Systemen von einem zeitlich sehr frühen und einem späteren Burst berichtet wird, wurde anschließend eine Inkubationszeit von 0-2 h, aufgeteilt in 15 Minuten-Intervalle, näher untersucht. Dabei konnte bei keinem der oben genannten Induktoren ein weiterer Burst gemessen werden, der signifikant verschieden zur Kontrolle war. Weiterhin erfolgte eine Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen in Gurken, die mit einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt behandelt und anschließend drei Tage später inokuliert wurden. Der Meßzeitraum erstreckte sich über 1-7 Tage nach Inokulation. Im Vergleich zu nicht induzierten, nur mit *S. fuliginea* befallenen Pflanzen war innerhalb dieser Zeitspanne die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nicht meßbar erhöht. Die Wirkung von Plantacur-E als Scavenger und Staurosporin als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inhibitor konnte ebenso quantitativ durch Messung des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reduzierung in Extrakt-induzierten Gurken durch Plantacur-E belief sich auf 50 %, die durch Staurosporin sogar um ca. 66 % (Tabelle 1).

**Tab. 1:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Gurkenblättern nach Infiltration von Plantacur-E bzw. Staurosporin und sechs-stündiger Inkubation im *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (*R. s.*).

	Kontrolle Aqua dest.	Kontrolle Staurosporin	Kontrolle Plantacur-E	1 % <i>R. s.</i>	Staurosporin + 1 % <i>R. s.</i>	Plantacur-E + 1 % <i>R. s.</i>
Konzentration H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ µM ]	3	3,5	2	22	8,5	11

Die Messung des extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Gerste erbrachte nach Induktion mit *R. sachalinensis*-Extrakt bzw. DCSA relativ zur Kontrolle eine vierfache Erhöhung der gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge nach 1 h. Das Durchschnittsgewicht der Gerstenblattsegmente betrug 23 mg. Die apoplastische Phase wird bei Primärblättern etwa zehn Tage alter Gerstenpflanzen mit 4,5 % (45 µl / g Frischgewicht; nach Winter et al. 1993) beschrieben, so daß sich ein Volumen von ca. 1 µl an apoplastischer Phase ergab. In Anlehnung an die Eichung bedeutete dies eine Nettoüberproduktion der Gerstenblattstücke von 3 µmol / µl Apoplast. In Gurkenblattscheiben (300 µl apoplastische Phase / g FG; nach Schneider-Müller 1991), die ein durchschnittliches Gewicht von 32 mg hatten, ergab sich eine Nettoüberproduktion von 211 µmol / µl Apoplast.

Ein weiterer oxidativer Burst im 6 h-Bereich wie bei induziertem Gurkengewebe konnte bei Gerste nicht gefunden werden (ohne Abbildung). Ebenso wie bei Gurke konnte auch hier an Blattstücken, die induziert und mit Mehltau inokuliert worden waren, 24-78 h nach Inokulation keine erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion gemessen werden (ohne Abbildung). Unterstützend dazu wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung in Gurkenpflanzen mit dem Fluoreszenzverfahren erfaßt. Die Untersuchungen zur Wirkung von Cantharidin ergaben, daß dieser H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produzent in Anwesenheit von Blattgewebe eine Fluoreszenz durch Oxidation von DHR 123 hervorrief. Ohne die Anwesenheit pflanzlichen Gewebes konnte dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Physcion in einer Konzentration von 20 ppm hatte in diesem System keine Wirkung. Trotz hoher Dosierung konnte auch hier keine Fluoreszenz nachgewiesen werden.

### 3.2.2 Lokalisation der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung im Gewebe

#### 3.2.2.1 Detektion mittels Tissue-Printing

Zur Klärung der Frage nach dem Ort der Wasserstoffperoxidbildung im Gurkengewebe wurden Gewebeabdrücke angefertigt. Bei den eigenen Untersuchungen traten die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktionsstellen der mit *R. sachalinensis* behandelten Gurkenblätter in Form von gleichmäßig verteilten, scharf abgegrenzten, runden Flecken in Erscheinung. Ein höher konzentrierter Extrakt (5 %) fiel in einigen wenigen Fällen durch gänzlich rötlich-braun verfärbte Blattnerven auf. Gurkenblätter, die mit einer DCINA-Lösung (1000 µM) infiltriert worden waren, verfärbten sich leicht violett und fleckig mit bräunlichen Interkostalbereichen (Abbildung 5). Eine Behandlung mit externem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2000 ppm) ist als Positivkontrolle mit maximaler Farbausprägung dargestellt. Bei Physcion-Behandlungen (2 ppm) konnten weder durch Infiltration noch durch Inkubation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsorte beobachtet werden. Die

Behandlung der Gurkenblätter mit 1 % bzw. 5 % Extrakt aus *R. sachalinensis* lieferte eine deutlich konzentrationsabhängige Färbung. In Anlehnung an eine Konzentrationsreihe in Form von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Dot-Blots auf der Membran konnte für einen 1 % Extrakt bis zu 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Ein 5 % Extrakt hingegen zeigte die Verfärbung für den Konzentrationsbereich 100-1000 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die hier nachweisbaren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen lagen damit deutlich über den extrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen. Dieser Unterschied begründet sich damit, daß im Tissue Printing intrazelluläres Wasserstoffperoxid nachgewiesen wurde, während bei den oben genannten Messungen nur aus dem Blatt herausdiffundiertes Peroxid erfaßt werden konnte. Daher ist auch bei den anderen Induktoren von höheren als den hier gezeigten Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Gewebe auszugehen. Zum Testen der Spezifität der nachgewiesenen Reaktionen wurden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-positive Proben vor Abdruck mit CAT behandelt. Diese Abdrücke wiesen dann keine Färbung mehr auf.

### 3.2.3.2 Detektion mittels Diaminobenzidin

Die Detektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsorten wurde weiterhin durch DAB-Staining nachgewiesen. Dieses Verfahren hatte im Vergleich zum Tissue Printing, welches H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nur in Zellbereichen nahe der Epidermis wiedergab, den Vorteil, auch die Reaktionen in tiefer liegenden Zellen des Mesophylls zu erfassen. Inkubation für 1-6 h in 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt mit anschließender DAB-Färbung zeigte einen Burst erst sechs Stunden nach Behandlung. Unbehandelte Kontrollen zeichneten sich durch minimale Hintergrundfärbung aus, bevorzugt an den Basiszellen von Trichomen, wie auch schon von Alvarez et al. (1998) als typisch beschrieben (Abbildung 6). Die Frage, inwieweit bei mit Extrakt behandelten und inokulierten Gurken ein Zusammenhang zwischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildungsorten und Penetrationsversuchen von *S. fuliginea* besteht, wurde ebenfalls untersucht und wird in Kapitel 3.10 näher beschrieben.

## 3.2.3 Lokalisation der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Bildung im Gewebe

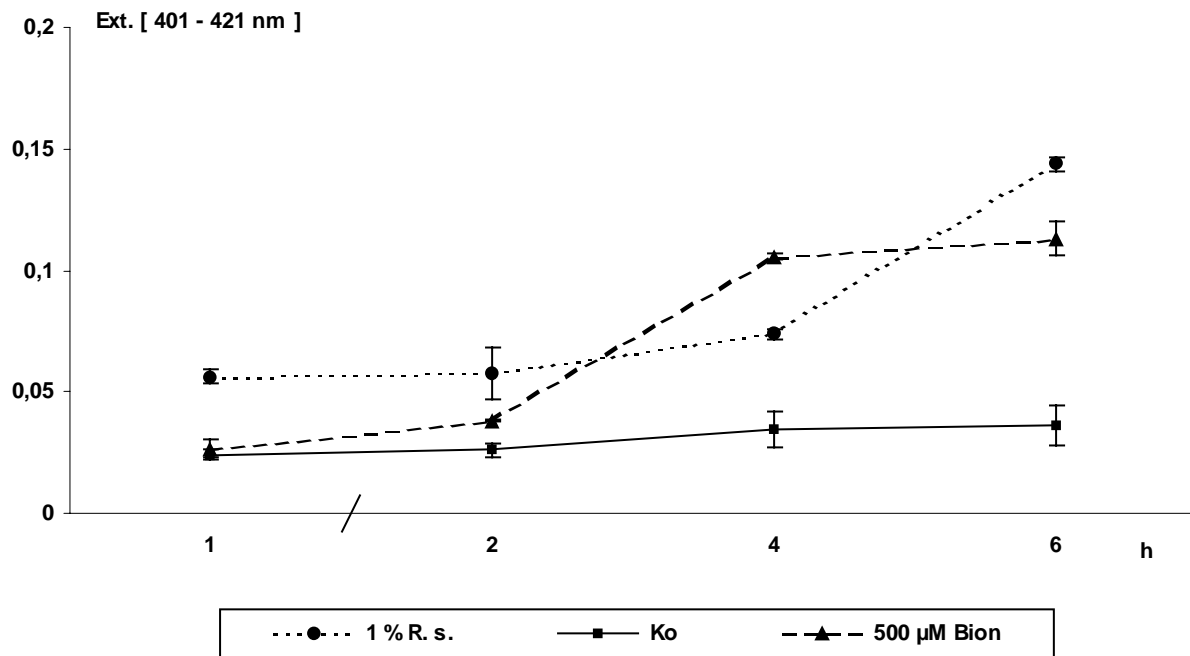
### 3.2.3.1 Detektion mittels Nitroblautetrazolium

Superoxidanionen sind in der Regel die Vorstufen zur Wasserstoffperoxidbildung. In Pflanzen wurden sowohl eine NADPH-Oxidase als auch eine Peroxidase innerhalb der Plasmamembran für die O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Synthese verantwortlich gemacht. Gurkenblattscheiben wurden vor einer NBT-Behandlung für 1-6 h in einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt inkubiert. Eine spezifische Anfärbung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> war schon nach 1 h möglich. Zu früheren Zeitpunkten war dagegen keine erhöhte Superoxidanionbildung zu verzeichnen. Es zeigten sich deutlich vom Hintergrund abgehobene lokale Spots, die intensiv blau angefärbt waren. Diese waren makroskopisch nicht an bestimmte Gewebebereiche gebunden. Die Detektion von O<sub>2</sub><sup>-</sup> konnte bis zu einem Inkubationszeitraum von 6 h beobachtet werden (Abbildung 7).

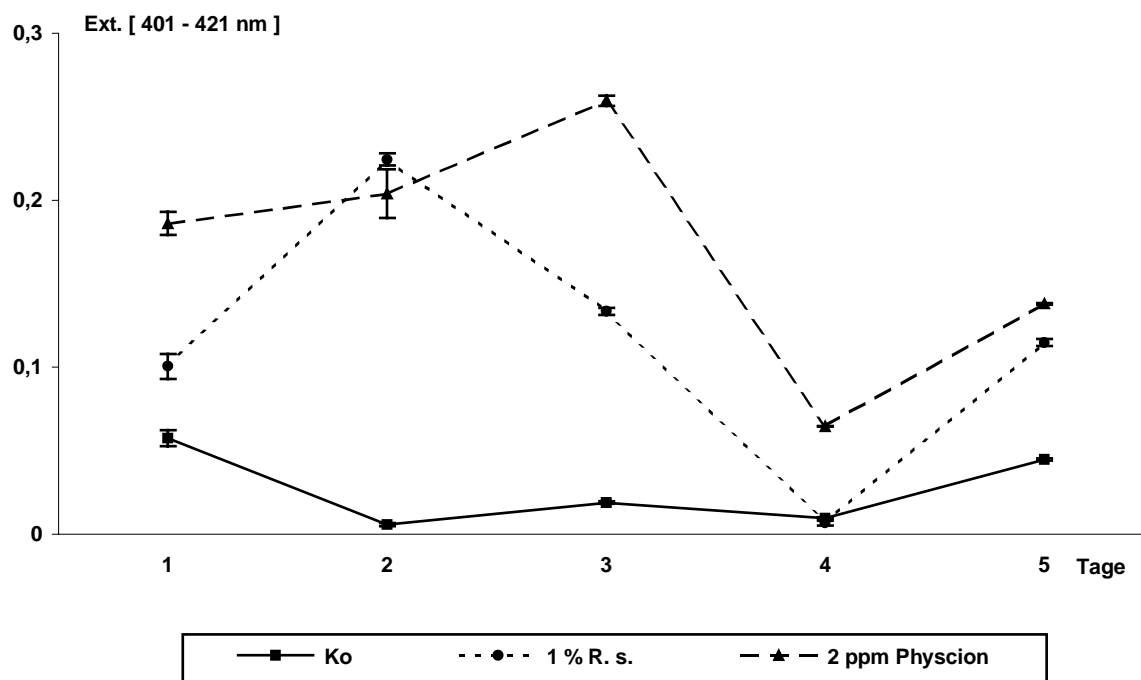
### 3.3 Beteiligung von NO an der Induzierten Resistenz

Stickoxid ist neben den Verbindungen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  ein weiteres freies, endogenes Radikal und kann in eine Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen einbezogen sein (Moncada et al. 1991). Unter anderem wird angenommen, daß NO bei der Ausbildung von Induzierter Resistenz in verschiedenartigsten Wirt-Pathogen-Systemen eine wichtige Rolle spielt.

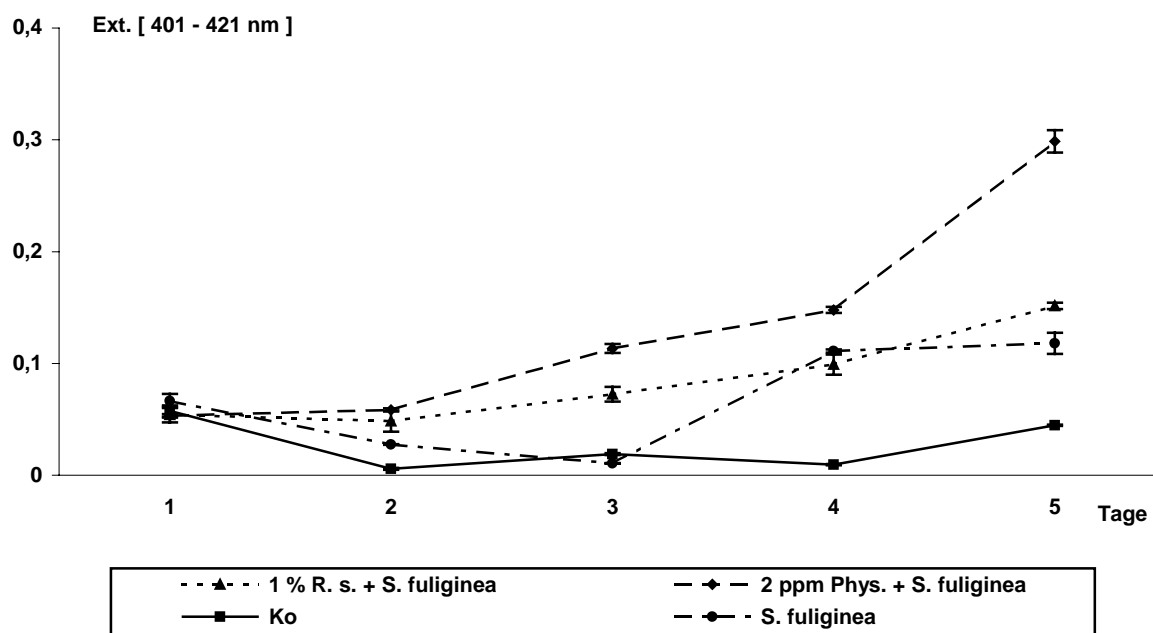
Erkennbar ist die erhöhte NO-Produktion im Verlauf einer 1-6 h andauernden Inkubation von Gurkenblättern mit 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt oder 500  $\mu\text{M}$  Bionlösung im direkten Vergleich zur Wasserkontrolle (Abbildung 8). Im gleichen Zeitraum wie der oxidative Burst wurde die vermehrte Bildung von NO nachgewiesen. Der Extrakt induzierte nach 6 h eine vierfache, Bion eine dreifache Steigerung der NO-Menge. Die Applikation von Physcion bewirkt wie die vom Gesamtextrakt eine ähnlich verlaufende NO-Bildung über mehrere Tage, aber mit stärkerer Wirkung von Physcion gegenüber dem Extrakt (Abbildung 9). Die NO-Produktion in Gurkenpflanzen, die mit 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt oder dessen Wirkbestandteil Physcion (2 ppm) besprüht und drei Tage später mit *S. fuliginea* inokuliert wurden, war im Vergleich zur Kontrolle ab dem 2. Tag erhöht (Abbildung 10). Infektion der Gurkenpflanzen mit Echtem Mehltau allein hatte erst vier Tage nach Inokulation eine gesteigerte NO-Bildung zur Folge. Damit wird deutlich, daß die Behandlung von Gurkenpflanzen mit Induktoren *per se* zu einer vermehrten NO-Menge im Gewebe führte, die anschließend durch das Pathogen noch gesteigert wurde.



**Abb. 8:** NO-Bildung in Gurkenblättern nach Inkubation in verschiedenen Induktorlösungen über 1-6 h (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, R. s. = *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt, n = 6).



**Abb. 9:** NO-Bildung in Gurkenblättern über 1-5 Tage nach Sprühapplikation der verschiedenen Resistenzinduktorlösungen (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, R.s. = *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt, n = 5).



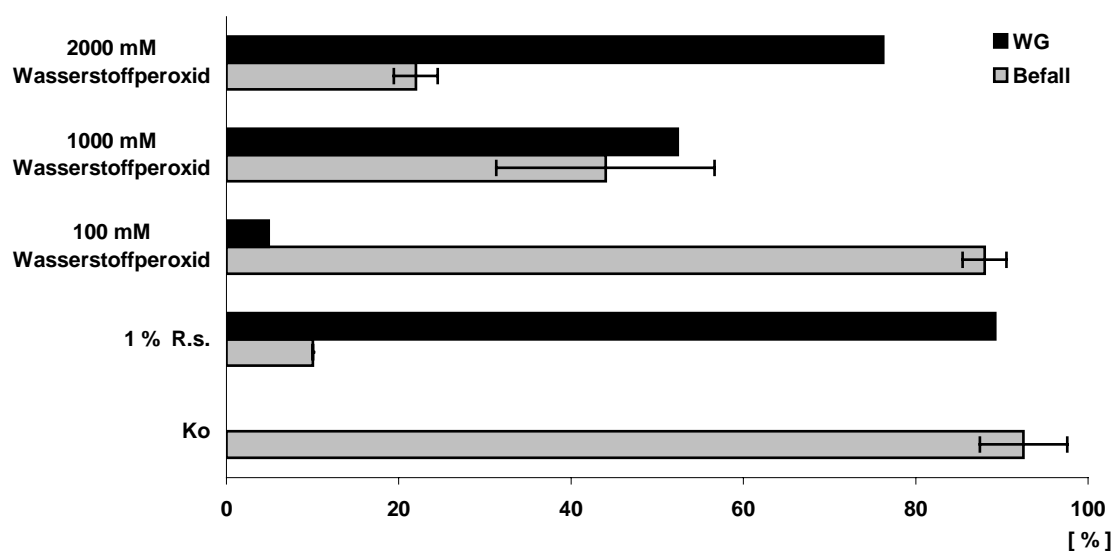
**Abb. 10:** NO-Bildung in Gurkenblättern über 1-5 Tage nach Sprühapplikation der verschiedenen Induktorlösungen und Inokulation mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, *S. fuliginea* = *Sphaerotheca fuliginea*, R.s. = *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt, Phys. = Physcion, n = 5).

### 3.4 Reaktionen der Wirtspflanze auf den Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulanzen

Mit dem Einsatz von externem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-liefernden Substanzen sollte geklärt werden, inwieweit diese die induzierende Wirkung von *R. sachalinensis* ersetzen können. Die Wirkstoffe wurden in unterschiedlichen Biotestverfahren auf ihre Wirksamkeit geprüft. Da diese Verbindungen verschiedene chemische Eigenschaften, wie z. B. Löslichkeit, Flüchtigkeit, Stabilität, Membranpermeation etc., aufwiesen, wurde durch Vorversuche das Ausbringungsverfahren ausgearbeitet und optimiert. Somit konnte gewährleistet werden, daß die Substanzen zu einem hohen Prozentsatz an ihren Wirkort gelangten.

#### 3.4.1 Externes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Externe Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als mögliche induzierend wirkende Substanz (Glied einer Signalkette) erwies sich bei Sprühapplikation als effektiv. Um eine direkte Wirkung auf das Pathogen zu vermeiden, sollte die Inokulation zeitlich verzögert durchgeführt werden. Da andererseits aus der Literatur bekannt ist, daß H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter aeroben Bedingungen im Licht in unmittelbarer Abhängigkeit von der Dosis relativ instabil ist (Levine et al. 1994), betrug die Zeitspanne zwischen Applikation und Inokulation maximal einen Tag, damit die Substanz noch in aktiver Form am Wirkort vorlag. Im Vergleich zu den eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulanzen ist bei externem Wasserstoffperoxid nicht bekannt, in welche Reaktionskette es eingeschleust wird bzw. wo sein Zielort liegt.

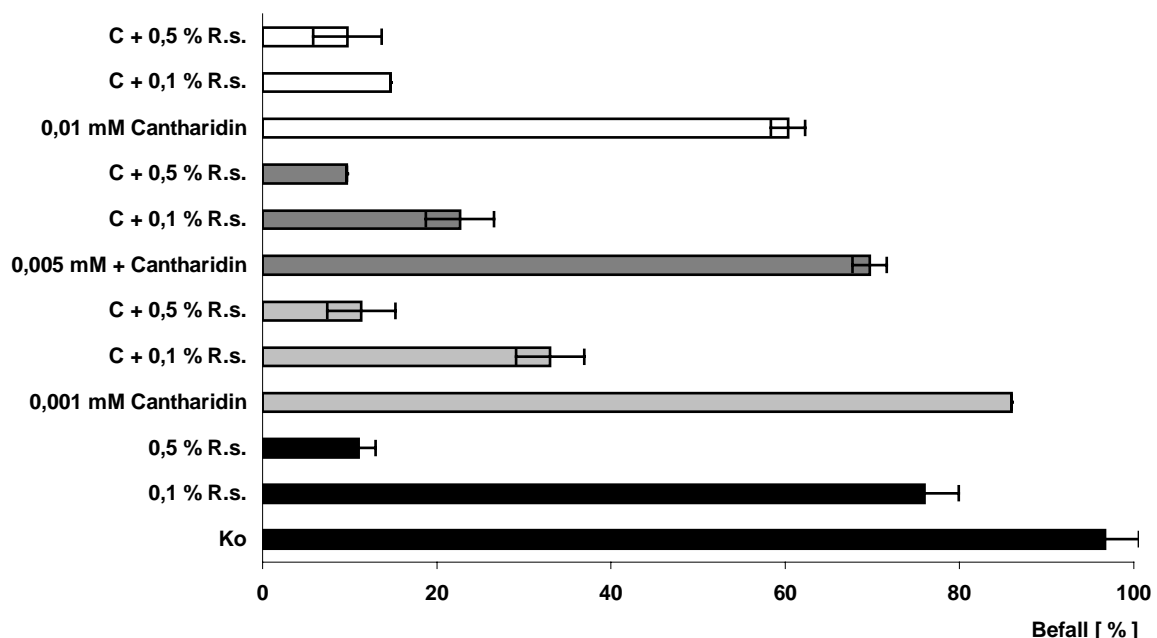


**Abb. 11:** Einfluß von Wasserstoffperoxidapplikationen auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, R.s. = *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt, WG = Wirkungsgrad nach Abbott, n = 10).

Eine Behandlung mit exogenem  $\text{H}_2\text{O}_2$  in den Konzentrationen 100 mM / 1000 mM / 2000 mM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hatte eine konzentrationsabhängige Erniedrigung des Befalls und damit eine Erhöhung des WG zur Folge (> 100 mM signifikant; Abbildung 11). Mit der höchsten Konzentration gingen jedoch phytotoxische Effekte in Form von Blattrandnekrosen und Nekrosen in der Blattfläche einher. Die befallsreduzierende Wirkung von exogenem  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigt, daß es selbst eine IR auslösen kann und somit als Signal in der Pflanze eine Rolle spielen könnte. Daß der WG der höchsten noch zu vertretenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge ohne Phytotoxizitätseffekte (54 %) signifikant verschieden vom WG der *R. sachalinensis*-Behandlung war, hängt vermutlich damit zusammen, daß die Applikationsmenge nur partiell das notwendige Zellkompartiment erreichte. Wie schon zuvor festgestellt wurde, mußten Konzentrationen von ca. 100 mM in der Pflanze vorliegen, um mit den Konzentrationen nach *R. sachalinensis*-Behandlung vergleichbar zu sein.

### 3.4.2 Proteinphosphatase-Inhibitor

Cantharidin ist ein Terpenoid, welches nur von Ölkäfern (Meloidae) und Scheinbockkäfern (Oedemeridae) produziert wird (Frenzel & Dettner 1995; Matsuzawa et al. 1987; McCormick & Carrel 1987). In Hinblick auf die Anwendung ist es relativ stabil und nicht flüchtig (Carrel & Eisner 1974). Pflanzen haben die Fähigkeit, appliziertes Cantharidin aufzunehmen und zu speichern. Es gehört zur Gruppe der Proteinphosphatase-Inhibitoren und gilt damit als Stimulans des oxidativen Bursts.

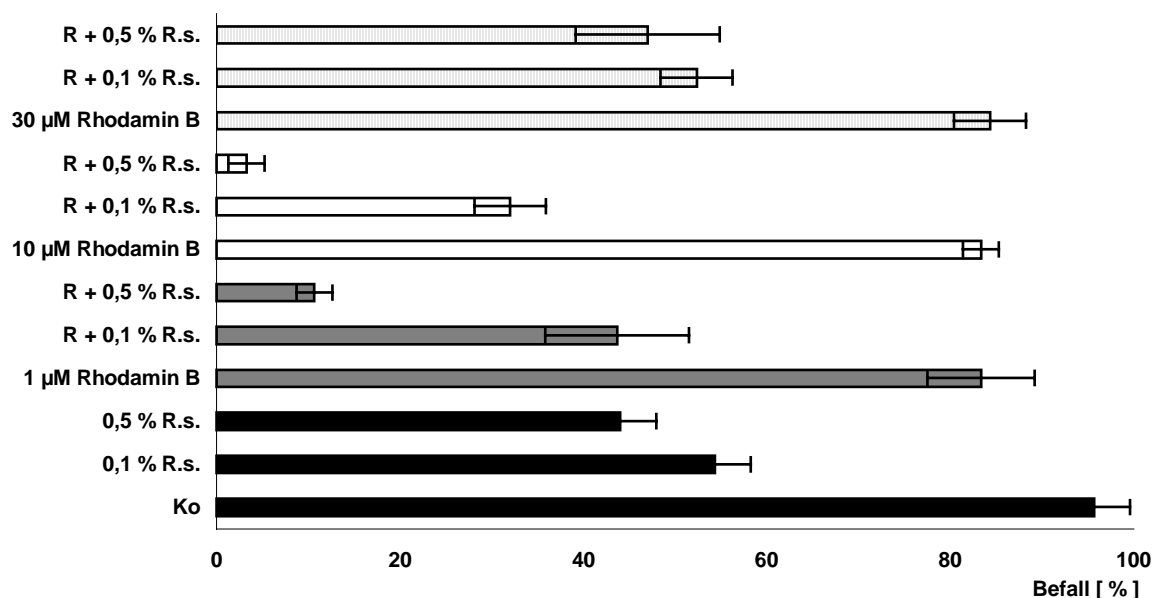


**Abb. 12:** Einfluß von Cantharidin und *R. sachalinensis*-Extrakt auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, C = Cantharidin, R.s. = *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt, n = 15).

Cantharidin wirkt im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle *per se* befallsreduzierend (Abbildung 12). In Kombination mit 0,1 % *R. sachalinensis*-Extrakt zeigte es eine bis zu 5fache Wirkungsverstärkung. Bereits 0,001 mM Cantharidin, die Konzentrationsstufe mit der geringsten Eigenwirkung, erhöhte die Wirkung des Extrakts um 65 % (2,3fach). Da die Befallsreduktion durch 0,5 % *R. sachalinensis*-Extrakt bereits sehr hoch war, kam es hier nach Kombination mit Cantharidin zu keiner sichtbaren Wirkungsveränderung mehr.

### 3.4.3 Redoxaktiver Farbstoff

Bei dem Farbstoff Rhodamin B handelt es sich um einen synthetischen Photosensitizer. Die Stärke seiner photosensibilisierenden Wirkung hängt von Faktoren wie Sensibilität des Objekts, Konzentration, Bestrahlungsdauer etc. ab. Pflanzen können Photosensitizer transportieren. Die Art und Weise der Aufnahme, der Transport innerhalb der Pflanze, die Beständigkeit der Effektivität und mögliche Toleranzen der Pflanze gegenüber dem Farbstoff sind noch nicht in jedem Fall geklärt. Unter Lichteinwirkung interagieren die angeregten Photosensitizer unter anderem mit molekularem Sauerstoff und es kommt zur Bildung von aktiven Sauerstoffspezies (Raab 1900; Spikes & Glad 1964).



**Abb. 13:** Einfluß von Rhodamin B und *R. sachalinensis*-Extrakt auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, R.s. = *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt, R = Rhodamin B, n = 15).



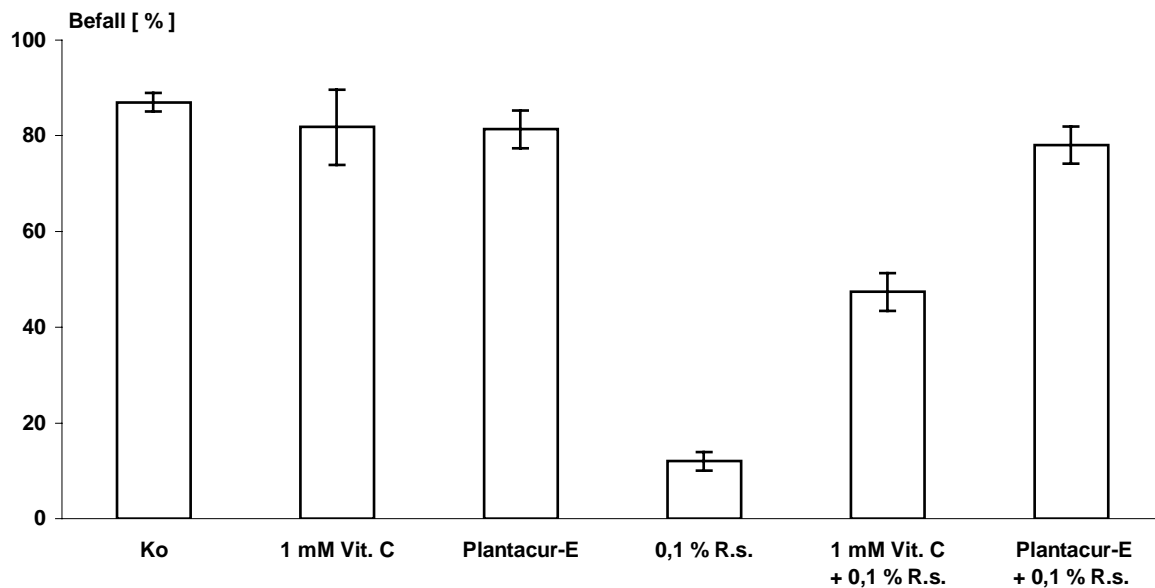
Rhodamin B wirkt *per se* bei Infiltration in Gurkenblattscheiben geringfügig befallsreduzierend (nicht signifikant; Abbildung 13). Gleiches gilt für die Injektion in Gurkenkotyledonen (ohne Abbildung). Eine Konzentrationsabhängigkeit ließ sich nicht feststellen. Synergistische bzw. additive Effekte von Rhodamin B mit *R. sachalinensis*-Extrakt konnten signifikant nur in den Kombinationen 1-10 µM Rhodamin / 0,5 % Extrakt und 10 µM Rhodamin / 0,1 % Extrakt nachgewiesen werden. Bei einer Konzentration von 30 µM Rhodamin B wurde seine Wirkung aufgrund von Phytotoxizität wieder aufgehoben. Zusammen mit Physcion hingegen erfolgten durch Rhodamin B keine derart ausgeprägten Befallsminderungen nach Infiltration der Substanz. Bei Injektion in Gurkenkotyledonen war keine Wirkung von Rhodamin B *per se* zu beobachten. Synergistische bzw. additive Effekte von Rhodamin B und Physcion waren signifikant, eine Konzentrationserhöhung des oxidativen Farbstoffes von 1 µM auf 10 µM erbrachte nicht die zu erwartende Wirkung in Form einer weiteren Befallsminderung.

### 3.5 Reaktionen der Wirtspflanze auf den Einsatz von Radikalfängern

Der mögliche Einfluß von Radikalfängern auf die Wirkung einer *R. sachalinensis*-Behandlung sollte hier geklärt werden. Unterbundene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entgiftung der Pflanzenzellen sollte sich nach Inokulation der Pflanzen in erhöhtem Befall mit *S. fuliginea* im Vergleich zur reinen *R. sachalinensis*-Behandlung äußern.

#### 3.5.1 Ascorbinsäure (Vitamin C)

Vitamin C übt durch verschiedene biochemische Reaktionen eine Scavenger-Funktion aus. Einerseits kann es die Reaktionspartner für die Bildung von Radikalen zuvor entfernen, andererseits das radikale Reaktionsprodukt wieder über enzymatische Schritte um- bzw. abbauen. Die hier zum Einsatz gekommenen Konzentrationen wurden in Vorversuchen ermittelt und stellen die jeweilige Grenze zur Phytotoxizität dar. Weiterhin wurde verglichen, ob Ascorbinsäure (pH 3,5) und ihr Salz (Ascorbat; pH 6,1) gleiche Wirkungseigenschaften besitzen. Vitamin C schwächt bei Injektion in die Gurkenkotyledonen die befallsreduzierende Wirkung eines 0,1 % *R. sachalinensis*-Extrakts signifikant ab (Abbildung 14). Sprühapplikation auf Gurkenprimärblätter zeigte ähnliche Ergebnisse (ohne Abbildung). Die Befallsminderung durch höher konzentrierte Extrakte (1 %) konnte durch Ascorbinsäure nicht verringert werden. Weder das Salz der Ascorbinsäure noch die freie Säure hatten hier einen signifikanten Einfluß. Auffällig war, daß Ascorbat generell pflanzenverträglicher war, was sich in verringerten Blattschädigungen oder Verzögerung der Vergilbung niederschlug.



**Abb. 14:** Einfluß von Ascorbinsäure (Vitamin C), Plantacur-E (Vitamin E) und *R. sachalinensis*-Extrakt (R.s.) auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, n = 15).

### 3.5.2 $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E)

Vitamin E ist im Gegensatz zur Ascorbinsäure ein fettlösliches Vitamin. Deswegen liegt die Problematik in einer effektiven Aufnahme der Substanz durch die pflanzlichen Zellwände. Alle Versuche haben dementsprechend gezeigt, daß Vitamin E ohne Formulierungshilfsstoff keinen Einfluß auf die induzierende Wirkung des Extrakts hatte. In allen drei verschiedenen Biotestverfahren war Vitamin E die Substanz, welche die größten Schwankungen hinsichtlich des zu bonitierenden Mehлтаubefalls zeigte. Insbesondere nach Sprühapplikation beeinträchtigte der Belag als solcher zwar die Haftung der Mehlausporen auf der Blattoberfläche nicht, wohl aber die Weiterentwicklung der Konidien bis hin zur Ausbildung des Mycel. Mit Vitamin E besprühte Gurkenpflanzen zeigten im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle eine starke Befallsreduzierung *per se*, die im Extremfall bis hin zur gänzlichen Befallsfreiheit reichte.

### 3.5.3 Plantacur-E

Plantacur-E ist im Gegensatz zur Reinsubstanz  $\alpha$ -Tocopherol ein formuliertes Vitamin E-Präparat. In detaillierten Vorversuchen mußte zuerst die geeignete Anwendungskonzentration für das Wirt-Pathogen-System Gurke / *S. fuliginea* ermittelt werden, da das Präparat vom Hersteller für die Apfelschorfbekämpfung ausgerichtet war. Aufgrund der Tatsache, daß Plantacur-E als Formulierung vorlag, war eine sichere Aufnahme in das Pflanzengewebe gewährleistet und nach der Ausbringung keine UV-Empfindlichkeit zu erwarten. Insgesamt zeigte Plantacur-E eine bessere Wirksamkeit als eine unformulierte Vitamin E-Lösung. Es wies nach Behandlung, d. h. ohne nachfolgende Extrakt-Applikation im

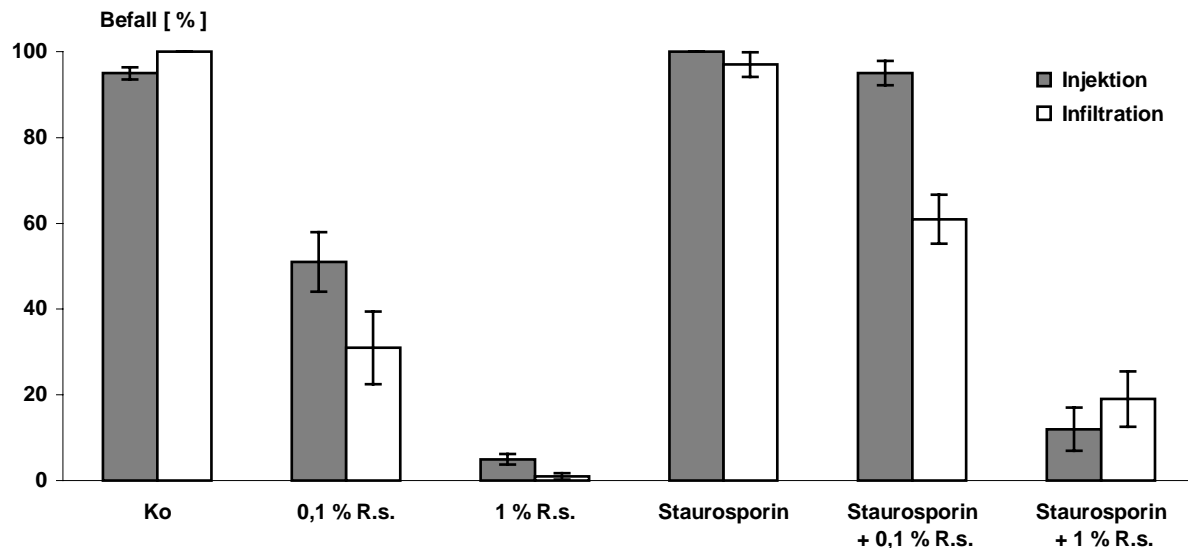
Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur eine geringfügige Eigenwirkung auf (Abbildung 14). Plantacur-E hatte von allen getesteten Scavengern die stärkste antioxidative Schutzfunktion, indem es die befallsreduzierende Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts aufhob bzw. abschwächte. Der prozentuale Mehltaubefall auf Gurken stieg nach 0,1 % Extrakt-Anwendung um 66 %, nach 1 % *R. sachalinensis*-Ausbringung um 13 % (ohne Abbildung). Die Tatsache, daß der Wirkstoffgehalt des formulierten Präparates gegenüber der reinen Vitamin E-Lösung um 50 % geringer war, legte den Schluß nahe, daß der Radikalfänger durch die Formulierung seinen Wirkort in der Pflanze sehr effektiv erreichen konnte. Der auffallend große Unterschied in der Aufhebung der induzierenden Wirkung eines 0,1 % oder 1 % Extrakts kann vielerlei Gründe haben wie z. B. das unausgeglichene Konzentrationsverhältnis von produzierten Radikalen durch den Extrakt und der Kapazität des Radikalfängers.

### 3.6 Reaktionen der Wirtspflanze auf den Einsatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inhibitoren

Der Einsatz von Inhibitoren der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung umfaßte die Verwendung von drei in ihrer Wirkungsweise sehr unterschiedlichen Substanzen, die, wie in der Literatur beschrieben, bereits in den verschiedensten Wirt-Pathogen-Systemen untersucht wurden. Im Gegensatz zu der zuvor beschriebenen Gruppe der Radikalfänger greifen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Hemmstoffe als Reaktionsglieder in eine Reaktionskette, die zur Bildung von Radikalen führt, ein.

#### 3.6.1 Proteinkinase-Inhibitor

Als ein solcher wurde Staurosporin eingesetzt. Es unterbindet die Proteinphosphorylierung. Für die nachgeschalteten Reaktionen bedeutet dies, daß kein Superoxidanion gebildet wird (Baker & Orlandi 1995). Bei gemeinsamer Anwendung mit einem *R. sachalinensis*-Extrakt (0,1 %) konnte Staurosporin (0,2 µM) den Befall mit *S. fuliginea* um 45 % im Vergleich zu einer reinen *R. sachalinensis*-Applikation signifikant erhöhen (Abbildung 15). Dabei wurde der Hemmstoff in die Gurkenkotyledonen injiziert und anschließend der Extrakt appliziert. Bei Infiltration von Staurosporin in Gurkenblattscheiben war die Infektion nur um 27 % gesteigert. Der Einsatz eines 1 % Extrakts in Kombination mit Staurosporin erbrachte hier eine Erhöhung des Mehltaubefalls um 7 % (Injektion) bis 18 % (Infiltration). Eine Staurosporinbehandlung allein zeigte im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle in beiden Biotestverfahren keine Befallsveränderung. Ebenso wenig konnte bei den beiden angewendeten Konzentrationen von 0,1 µM und 0,2 µM Staurosporin eine Dosisabhängigkeit beobachtet werden (ohne Abbildung). Die jeweilige Befallserhöhung, hervorgerufen durch die Staurosporin-Behandlung, ging einher mit einer partiellen Reduktion der Wasserstoffperoxidkonzentration im Gewebe (s. Kapitel 3.2.1).



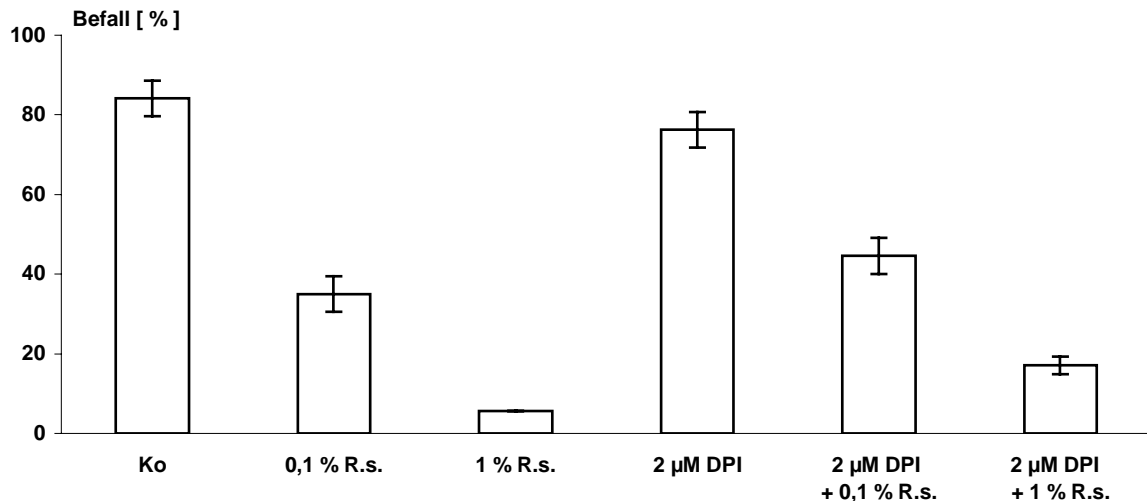
**Abb. 15:** Einfluß von Staurosporin (0,1  $\mu$ M) und *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R. s.) auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, n = 10).

### 3.6.2 Xanthinoxidase-Inhibitor

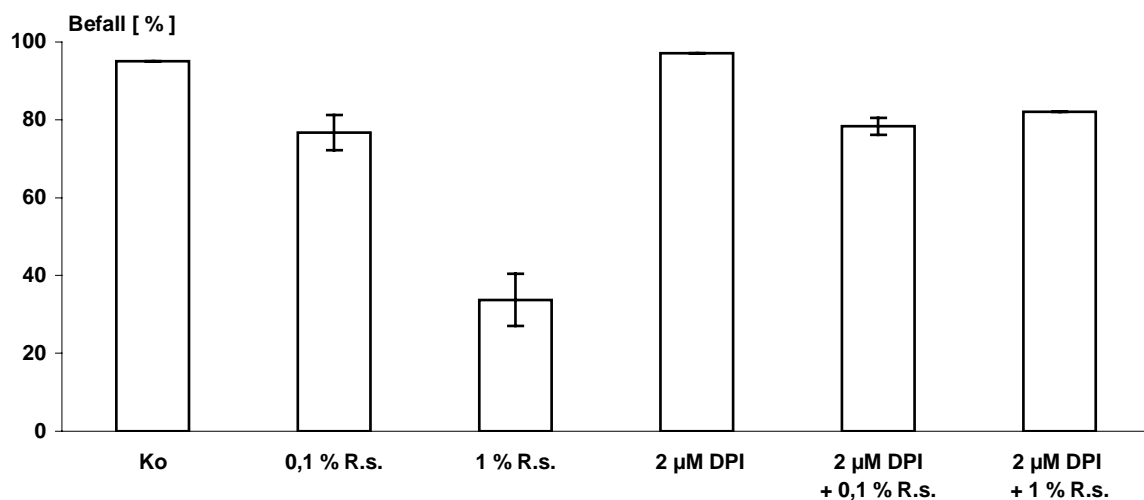
Xanthinoxidase ist ein Enzym, welches über eine spezielle Reaktionskette an der Bildung von Wasserstoffperoxid beteiligt ist. Zur Hemmung dieses Enzyms wurde Allopurinol u. a. mittels Gießapplikation eingesetzt, da bekannt ist, daß Allopurinol über die Wurzeln aufgenommen und innerhalb der Pflanze transportiert werden kann. Dabei wurden zwei Gießverfahren miteinander verglichen, die sich in ihrer Zeitspanne zwischen Einsatz von Allopurinol und Applikation des Extrakts stark unterschieden. Allopurinol zeigte sowohl bei Anwendung an den Blättern als auch nach Gießapplikation keine signifikante Wirkung in Hinblick auf eine Befallsänderung bei gleichzeitiger Anwendung mit einem *R. sachalinensis*-Extrakt. Übliche Zeitintervalle, wie Einsatz von Hemmstoff acht bis zehn Tage vor Inokulation und eine Erhöhung der Dosis bis auf 400  $\mu$ M, hatten keinen Einfluß auf den Befall (ohne Abbildung). Generell unterlag der Befall Allopurinol-behandelter Gurken großen Schwankungen. Sogar eine Befallsreduktion durch diesen Hemmstoff konnte zuweilen verzeichnet werden, die gegensätzlich zur typischen Wirkungsweise der Substanz war (ohne Abbildung). Eine auffällige positive Nebenwirkung von Allopurinol war die Verzögerung der Seneszenz der Gurkenblätter.

### 3.6.3 NADPH-Oxidase-Inhibitor

Die mögliche Beteiligung einer NADPH-Oxidase an der induzierenden Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts sollte durch den Einsatz von DPI geklärt werden, einem Hemmstoff der Flavoprotein-Komponente der NADPH-Oxidase.



**Abb. 16:** Einfluß von Diphenyliodoniumchlorid-Sprühapplikation (DPI) und *R. sachalinensis*-Extrakt (R.s.) auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, n = 12).



**Abb. 17:** Einfluß von Diphenyliodoniumchlorid-Infiltration (DPI) und *R. sachalinensis*-Extrakt (R.s.) auf den Befall von Gurken mit *S. fuliginea* (Ko = wasserbehandelte Kontrolle, n = 12).

Die Behandlung von Gurkenpflanzen mit DPI in Form einer Sprühapplikation auf die Laubblätter bzw. Infiltration und einer Injektion von Kotyledonen mit anschließender Ausbringung des Extrakts zeigte im Vergleich zur reinen Extraktbehandlung eine befallserhöhende Wirkung (Abbildungen 16 + 17). Die Erhöhung des Mehltaubefalls im Vergleich zur *R. sachalinensis*-Anwendung (1 %) belief sich bei Sprühapplikation von DPI auf 11 %, bei Infiltration auf 48 %. Dabei wurden DPI-Konzentrationen von 1-2 µM verwendet, die jedoch keine Aussage über eine Dosis-Wirkungsbeziehung zuließen. Bei

Anwendung von DPI allein konnte keine signifikante Befallsveränderung verzeichnet werden, ebensowenig bei Anwendung einer kombinierten DPI / 0,1 % Extrakt-Behandlung.

### 3.7 Enzymaktivitäten

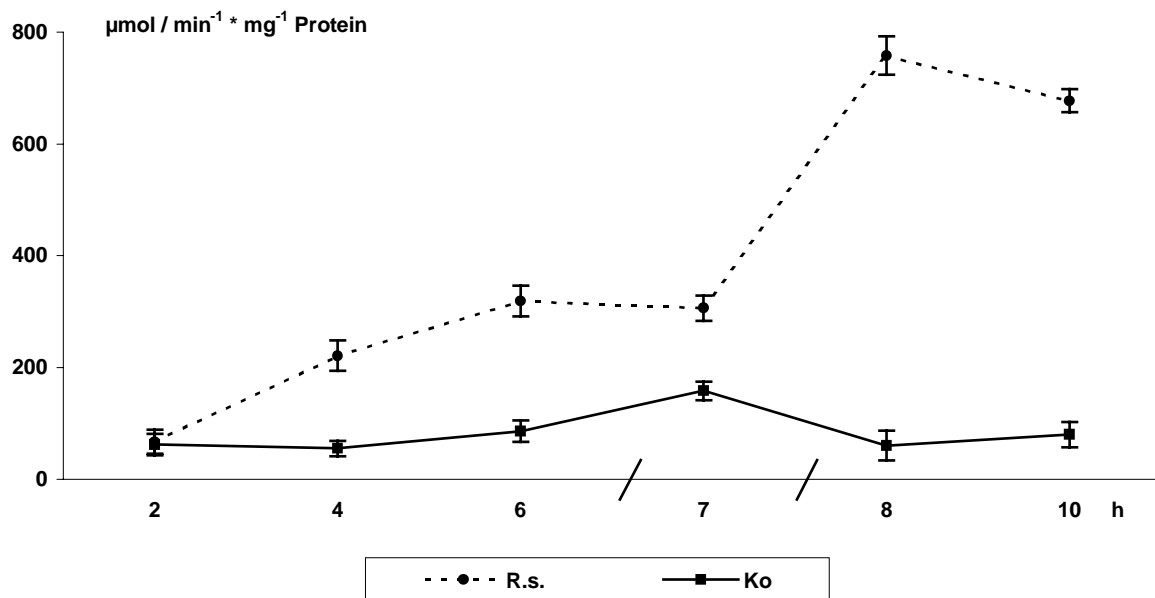
Die wichtigsten Enzyme des antioxidativen Schutzsystems in Pflanzen, wie POX, CAT, SOD, GR, GT und CHI, wurden hier in Hinblick auf ihre Beteiligung an der Signalkette von *R. sachalinensis*-Extrakt untersucht. Dabei handelte es sich um Enzyme, die am Auf-, Um- und Abbau von Sauerstoffradikalen beteiligt sind.

#### 3.7.1 Enzymreaktionen in der Wirtspflanze nach Induktorbehandlung

Die Messungen von enzymatischen Aktivitäten nach alleiniger Induktorbehandlung erfolgten nach Inkubation des Gurkengewebes in Induktorlösungen für 1-14 h (max. 24 h).

##### 3.7.1.1 Peroxidase

POX kann Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren oder mittels Elektronendonatoren über die Reduktion von Sauerstoff Wasserstoffperoxid bilden.



**Abb. 18:** Peroxidase-Aktivität in Gurkenblättern nach Inkubation in einem 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R. s.) über 1 - 10 Stunden (n = 5).

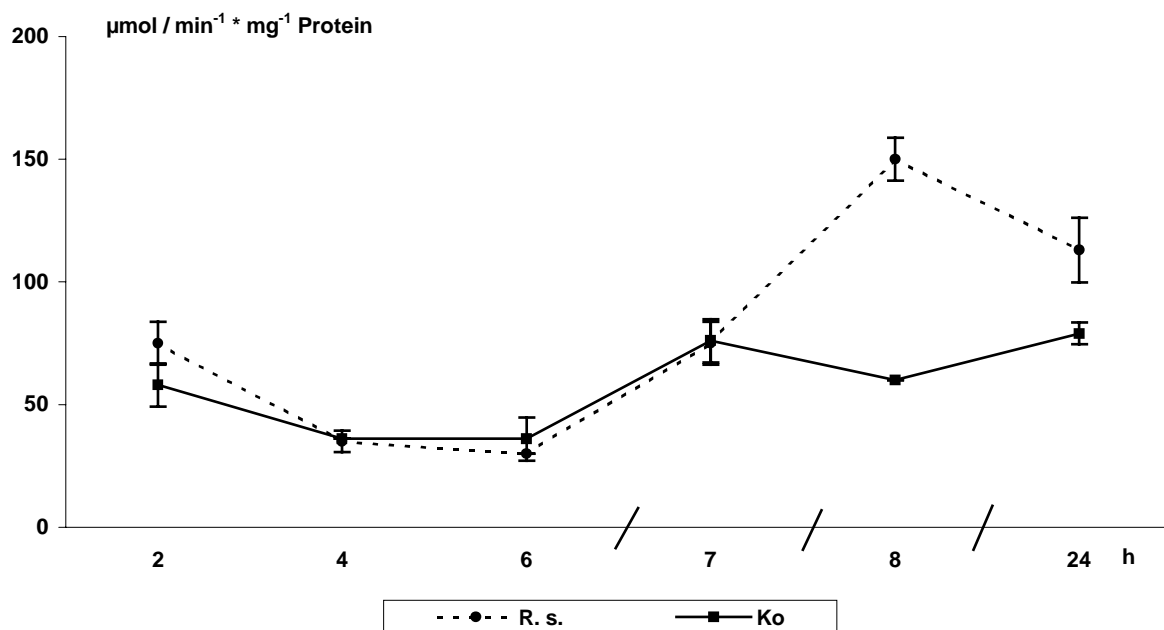
In Blatthomogenaten *R. sachalinensis*-behandelter Gurkenpflanzen war bereits nach 4 h ein Anstieg der POX-Aktivität zu beobachten (Abbildung 18). Im Vergleich zu der wasserbehandelten Kontrolle (ca. 55  $\mu\text{mol Substrat} / \text{min} * \text{mg Protein}$ ) war die Aktivität vierfach erhöht. Nach etwa 8 h erreichte die POX-Aktivität einen Maximalwert (ca. 760  $\mu\text{mol Substrat} / \text{min} * \text{mg Protein}$ ), der ungefähr sechs- bis siebenmal so hoch war wie die Aktivität in Kontrollblättern. Die Inkubation von Gurkenblattscheiben in einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt ergab somit eine Steigerung der POX-Aktivität, die in Übereinstimmung mit dem Zeitpunkt des oxidativen Burst ( $> 6 \text{ h}$ ) verlief.

### 3.7.1.2 Catalase

CAT beschleunigt zum einen die Zerlegung von Wasserstoffperoxid in Wasser und  $\text{O}_2$ , zum anderen katalysiert sie die Oxidation von H-Donatoren. Die Beobachtungen im Zeitraum von 1-6 h zeigten, daß keine erhöhte CAT-Aktivität mit dem oxidativen Burst nach 6 h in Zusammenhang gebracht werden konnte (ohne Abbildung). Nach 24 h Inkubation in *R. sachalinensis*-Extrakt war aber vermehrt CAT-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Erhöhte CAT-Aktivitäten, die ein bis zwei Tage nach Inokulation von Extrakt-behandelten Pflanzen auftraten, könnten daher allein auf die Induktion zurückgeführt werden (vgl. Abbildung 24).

### 3.7.1.3 Superoxiddismutase

SOD katalysiert die Disproportionierung von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid.

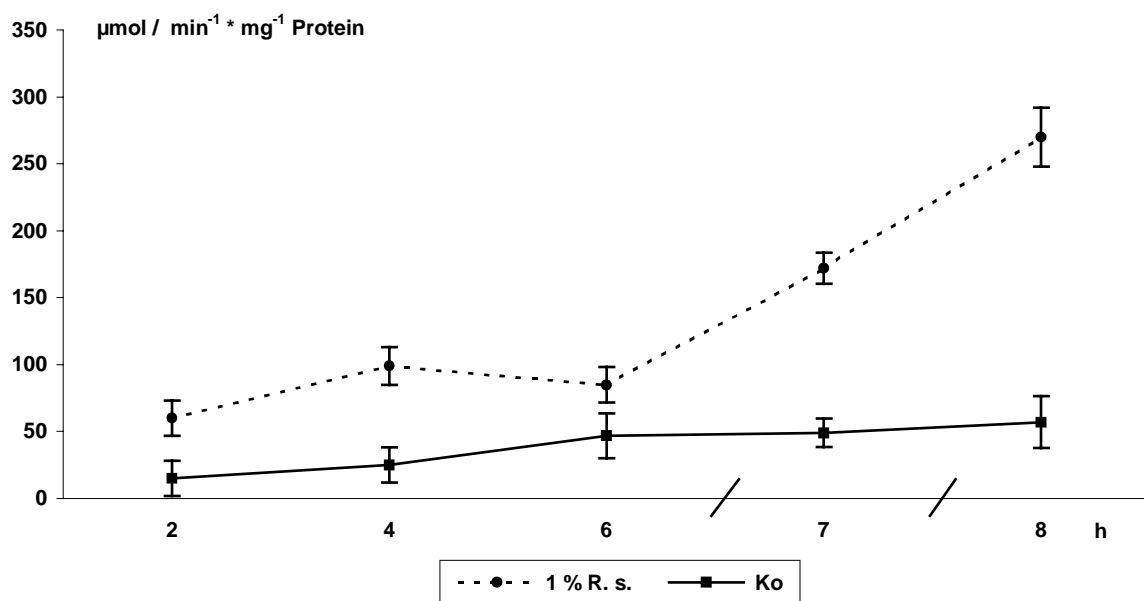


**Abb. 19:** Superoxiddismutase-Aktivität in Gurkenblättern nach Inkubation in einem 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R. s.) über 2 - 24 Stunden (n = 5).

Die SOD-Aktivität erreichte nach Inkubation von Gurkenblattscheiben für 2-24 h in 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt nach 8 h ein Maximum von ca. 150  $\mu\text{mol Substrat} / \text{min} * \text{mg Protein}$  (Abbildung 19). Diese Erhöhung war signifikant unterschiedlich zur wasserbehandelten Kontrolle. Das Superoxidanion, das Substrat für die SOD-Aktivität, konnte in Extrakt-behandelten Gurkenpflanzen sogar schon zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden.

#### 3.7.1.4 Glutathionreduktase

Die GR-Funktion ist die Aufrechterhaltung der intrazellulären reduzierten Glutathion (GSH)-Konzentration, welche für die direkte Reduktion von oxidierten Protein-Thiol-Gruppen, z. B. in Enzymen, bereitstehen muß. Die GR-Aktivität in Gurkenblattgewebe, welches 2-8 h in 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt inkubiert worden war, zeigte über den ganzen Zeitraum eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle, wobei ab einer sechsstündigen Behandlung die Aktivität stark zunahm und nach 8 h ein Niveau von ca. 270  $\mu\text{mol Substrat} / \text{min} * \text{mg Protein}$  erreichte (Abbildung 20). Auch hier war der Anstieg der GR-Aktivität in zeitlicher Übereinstimmung mit dem durch *R. sachalinensis*-Extrakt induzierten oxidativen Burst.

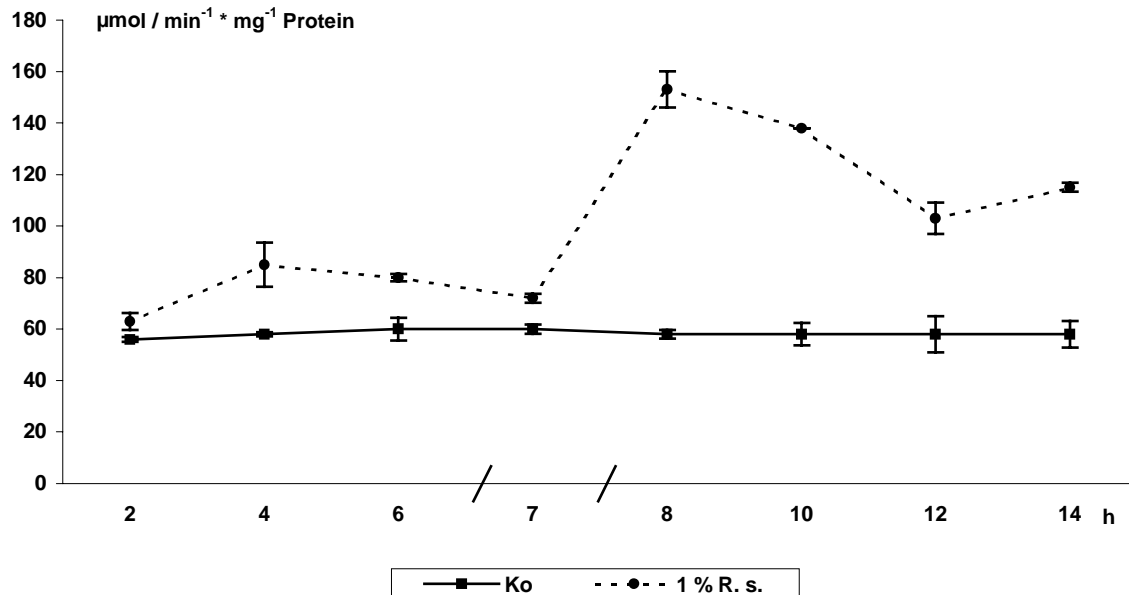


**Abb. 20:** Glutathionreduktase-Aktivität in Gurkenblättern nach Inkubation in einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt (R. s.) über 8 Stunden (n = 5).



### 3.7.1.5 Glutathion-S-transferase

Dieses Enzym katalysiert die Konjugation von u. a. hydrophoben, toxischen Verbindungen mit Glutathion, um nicht-toxische Peptid-Derivate zu bilden.

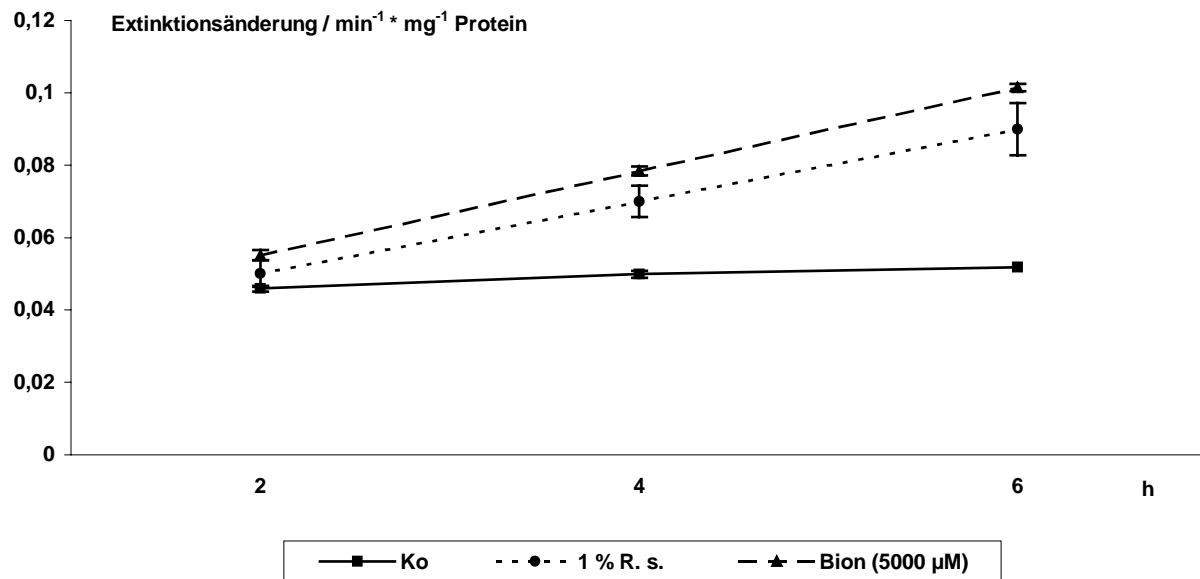


**Abb. 21:** Glutathion-S-transferase-Aktivität in Gurkenblättern nach Inkubation in einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt (R. s.) über 1 -14 Stunden (n = 5).

Gurkengewebe wurde 2-14 h in einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt inkubiert und anschließend auf enzymatische Aktivität untersucht. Eine verstärkte GT-Reaktion konnte nach 8 h festgestellt werden (Abbildung 21). Erreicht wurde dabei eine umgesetzte Substratmenge von ca. 150  $\mu\text{mol}$  Substrat / min \* mg Protein. Nach 14 Stunden war das Aktivitätsniveau auf ca. 120  $\mu\text{mol}$  Substrat / min \* mg wieder abgesunken. Die Tatsache, daß die GT-Aktivität dabei ca. 1 h später anstieg als GR, weist darauf hin, daß GT wahrscheinlich die Reaktionsprodukte von GR weiterverarbeitete.

### 3.7.1.6 Chalkonisomerase

CHI katalysiert die Umwandlung von Naringenin-Chalkon zu Naringenin, eine Reaktion in der Flavonoid-Biosynthese. Die Inkubation von Gurkenblattscheiben für 2-6 h in 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt oder in einer 5000  $\mu\text{M}$  Bionlösung ergab, verglichen mit der Kontrolle, eine mit der Zeit stetig steigende Aktivitätserhöhung (Abbildung 22). Auffallend war der relativ parallele Aktivitätsverlauf bei Behandlung mit zwei unterschiedlichen Induktoren.



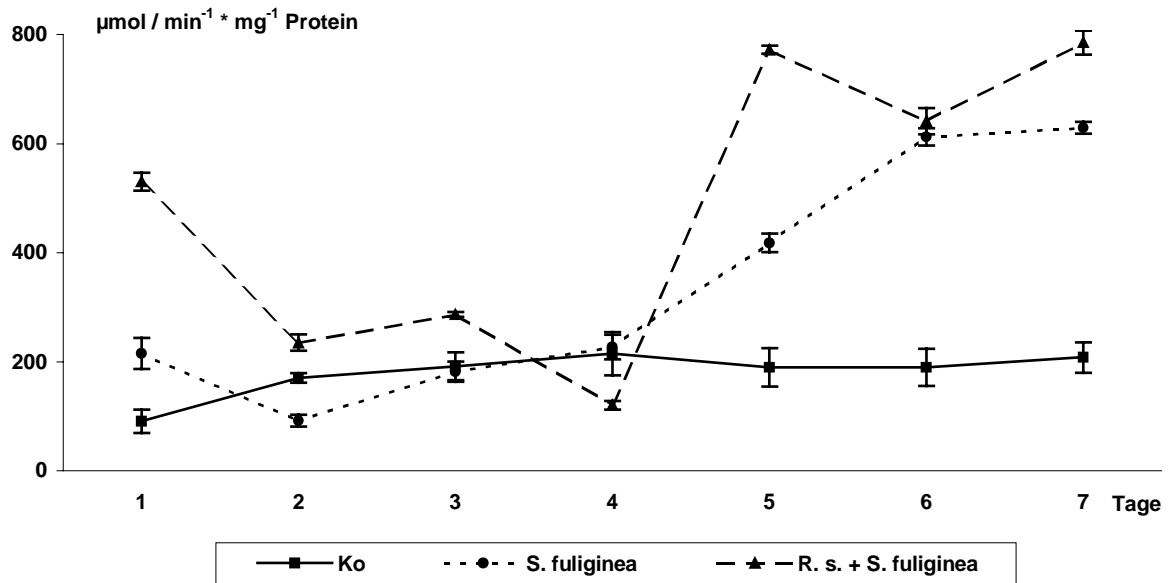
**Abb. 22:** Chalkonisomerase-Aktivität in Gurkenblättern nach Inkubation in einem 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R. s.) oder einer Bionlösung (5000 µM) über 2 - 6 Stunden (n = 5).

### 3.7.2 Enzymreaktionen in der Wirtspflanze nach Induktorbehandlung und Pathogenbefall

Die nachfolgend beschriebenen und dargestellten Aktivitätsänderungen umfaßten Untersuchungen zum Einfluß einer Mehltauinfektion auf die Enzymaktivität in Gurkenpflanzen, im Vergleich zur Kombination von Induktor und Pilzbefall in einem Zeitraum von ein bis sieben (max. acht) Tagen nach Inokulation.

#### 3.7.2.1 Peroxidase

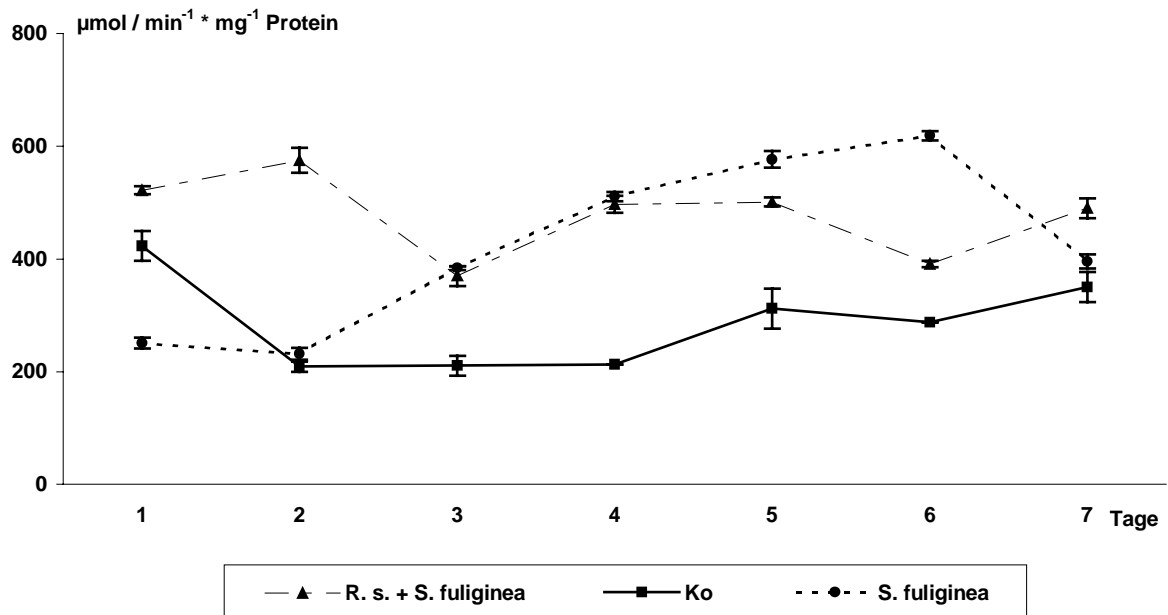
Zu Untersuchung der POX-Aktivität nach *R. sachalinensis*-Behandlung und zusätzlicher Mehltauinfektion wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen in eintägigem Abstand Blattproben entnommen, aufgearbeitet und die Aktivität wurde in den Blatthomogenaten gemessen. Ein erhöhte POX-Aktivität war im Vergleich zur Kontrolle sowohl bei *S. fuliginea*-inokulierten Pflanzen als auch bei Gurken zu verzeichnen, die zuvor mit 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt induziert wurden (Abbildung 23). Die hohe Aktivität von ca. 550 µmol Substrat / min \* mg Protein nach 24 h war etwas niedriger als 10 h nach Applikation des Induktors, als ein Niveau von ca. 700 µmol Substrat / min \* mg Protein erreicht wurde (vgl. Abbildung 19). Die vorherige Extrakt-Behandlung vor *S. fuliginea*-Inokulation war bei direktem Vergleich der Aktivität mit einer Inokulation allein zunächst nicht sehr wirksam. Erst ab dem fünften Tag glich sich die Mehltauinfektion von zuvor induzierten Gurkenpflanzen mit der von nicht-induzierten Pflanzen an, so daß am siebten Tag Aktivitäten von 600-800 µmol Substrat / min \* mg Protein erfaßt werden konnten. Eine stetig ansteigende Aktivitätserhöhung, wie sie parallel zur Pathogenentwicklung allein zu verzeichnen war, wird in den ersten vier Tagen bei induzierten Pflanzen durch die Wirkung des Extrakts verzögert.



**Abb. 23:** Peroxidase-Aktivität in mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) induzierten Gurkenblättern 1 - 7 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* (n = 5).

### 3.7.2.2 Catalase

Die CAT-Aktivität wurde durch Verfolgen der Wasserstoffperoxidspaltung gemessen. Bei der Messung mußte beachtet werden, daß es nicht möglich ist, das Enzym mit Substrat zu sättigen; andererseits wird es durch zu hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration inaktiviert.

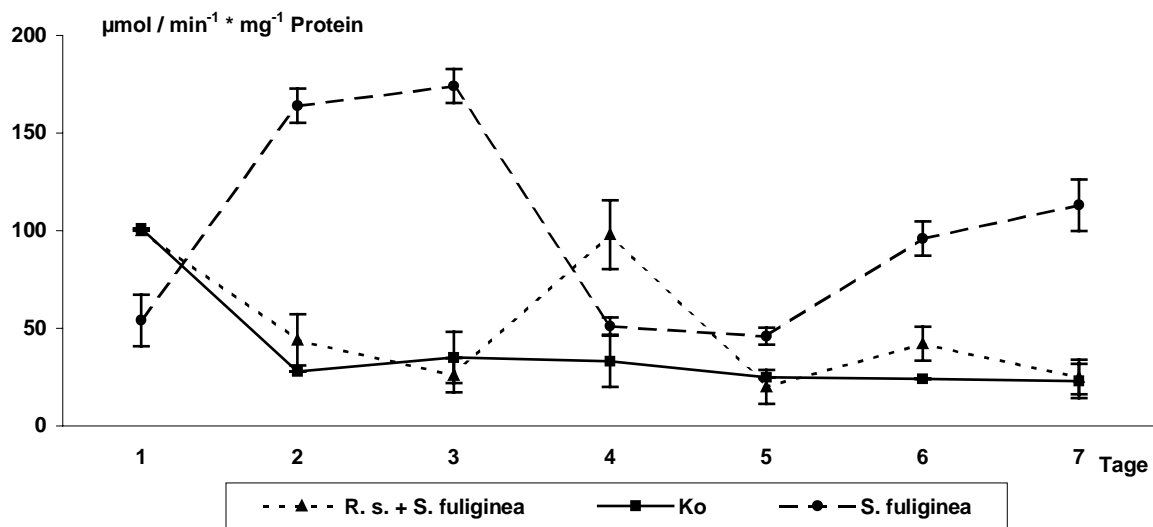


**Abb. 24:** Catalase-Aktivität in mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) induzierten Gurkenblättern 1 - 7 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* (n = 5).

Bei mit *S. fuliginea* inokulierten Gurkenpflanzen ging vom zweiten bis sechsten Tag mit dem Verlauf der Pilzentwicklung eine stetig steigende CAT-Aktivität einher (Abbildung 24). Das Maximum wurde am sechsten Tag nach Inokulation mit ca. 600  $\mu\text{mol}$  Substrat / min \* mg Protein erreicht. Hier konnte in der Regel von einer sehr hohen Befallsdichte mit Gurkenmehltau ausgegangen werden. Mit *R. sachalinensis*-Extrakt induzierte und inokulierte Pflanzen zeigten erst ab dem dritten Tag nach der Infektion, d. h. um einen Tag verzögert, einen Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich zu nur inokulierten Pflanzen. Das hohe Niveau am ersten und zweiten Tag könnte noch eine Reaktion auf die Induktion mit dem Extrakt sein.

### 3.7.2.3 Superoxiddismutase

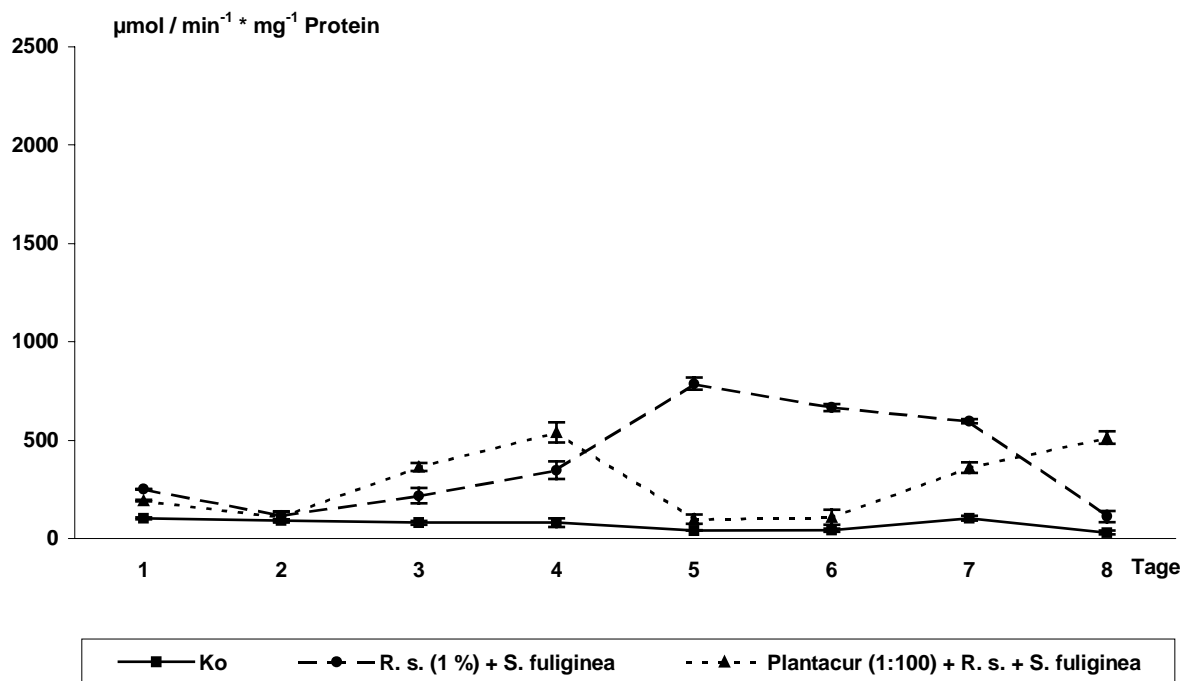
Die SOD-Aktivität konnte zum einen als relative Farbänderung, zum anderen als relative Aktivitätsänderung dargestellt werden, wobei letzteres Verfahren hier graphisch festgehalten wurde. Erhöhte SOD-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle war insbesondere bei mit *S. fuliginea* inokulierten und zeitweilig auch bei solchen Gurkenpflanzen zu verzeichnen, die zuvor mit einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt induziert und drei Tage später inokuliert wurden (Abbildung 25). Nur mit Gurkenmehltau befallene Pflanzen zeigten schon sehr bald nach der Infektion vermehrte SOD-Aktivität (zweiter bis dritter Tag), die ein Aktivitätsmaximum mit ca. 175  $\mu\text{mol}$  Substrat / min \* mg Protein erreichte. Nach vorheriger Induktion war dieses abgeschwächt und trat erst am vierten Tag auf.



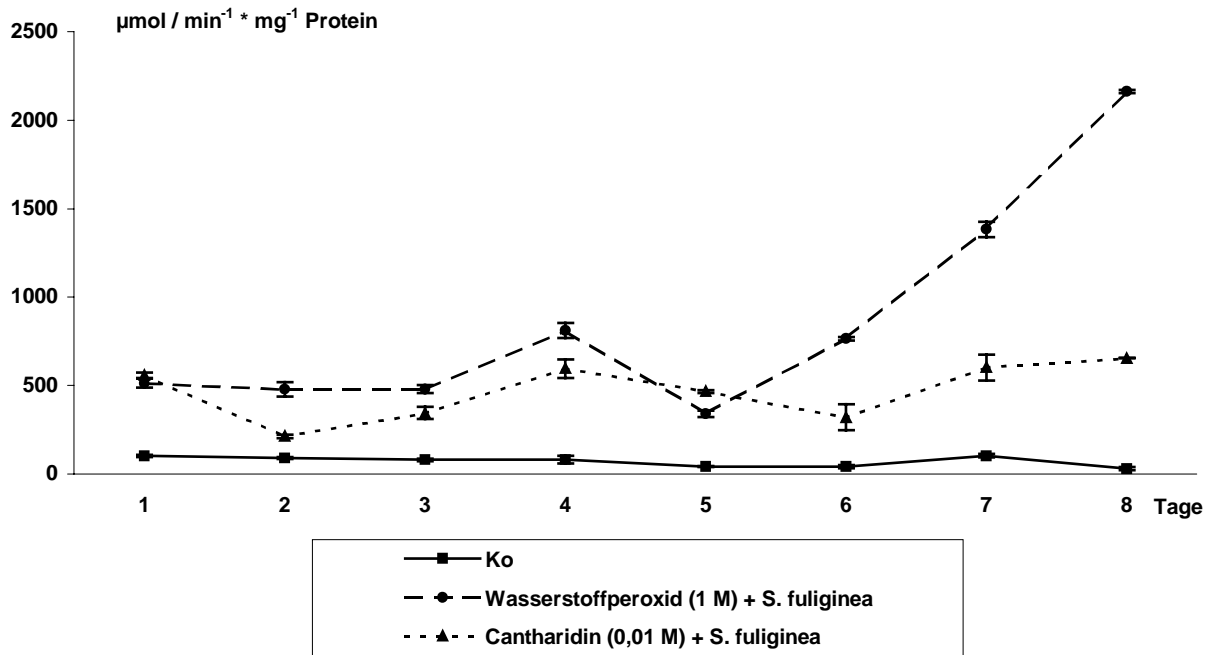
**Abb. 25:** Superoxiddismutase-Aktivität in *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) induzierten Gurkenblättern 1 - 7 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* (n = 5).

### 3.7.2.4 Glutathionreduktase

Bei den Untersuchungen zur GR-Aktivität in Gurkenpflanzen wurde einerseits die Wirkung des Extrakts *per se* und mit dem gleichzeitigen Einsatz eines Scavengers eine mögliche Aktivitätsänderung analysiert. Andererseits wurde durch die Verwendung von externem  $H_2O_2$  und  $H_2O_2$ -Produzenten der Zusammenhang mit der Signalkette des oxidativen Bursts untersucht. Mit *R. sachalinensis*-Extrakt induzierte und mit Mehltau inokulierte Gurkenpflanzen wiesen ab dem dritten Tag nach Inokulation im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte GR-Aktivität auf, die ihr Maximum um den fünften Tag zeigte und bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (achter Tag) wieder gänzlich abfiel. Ein Radikalfänger (Plantacur-E) in Verbindung mit dem Extrakt verursachte eine deutlich geringere GR-Maximalaktivität. Die steigende Aktivität ab dem siebten Tag verlief parallel zur stark einsetzenden Mehltauentwicklung. Gänzlich fehlende Aktivität am fünften bis sechsten Tag bei zuvor gemessener Aktivität von ca. 500  $\mu\text{mol Substrat} / \text{min} * \text{mg Protein}$  (vierter Tag) deutet darauf hin, daß hier Extrakt- und Scavengerwirkung miteinander im Gleichgewicht stehen (Abbildung 26 A).



**Abb. 26 A:** Glutathionreduktase-Aktivität in mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) induzierten Gurkenblättern ohne und mit zusätzlicher Vitamin E-Applikation (Plantacur-E) 1 - 8 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* (n = 5).

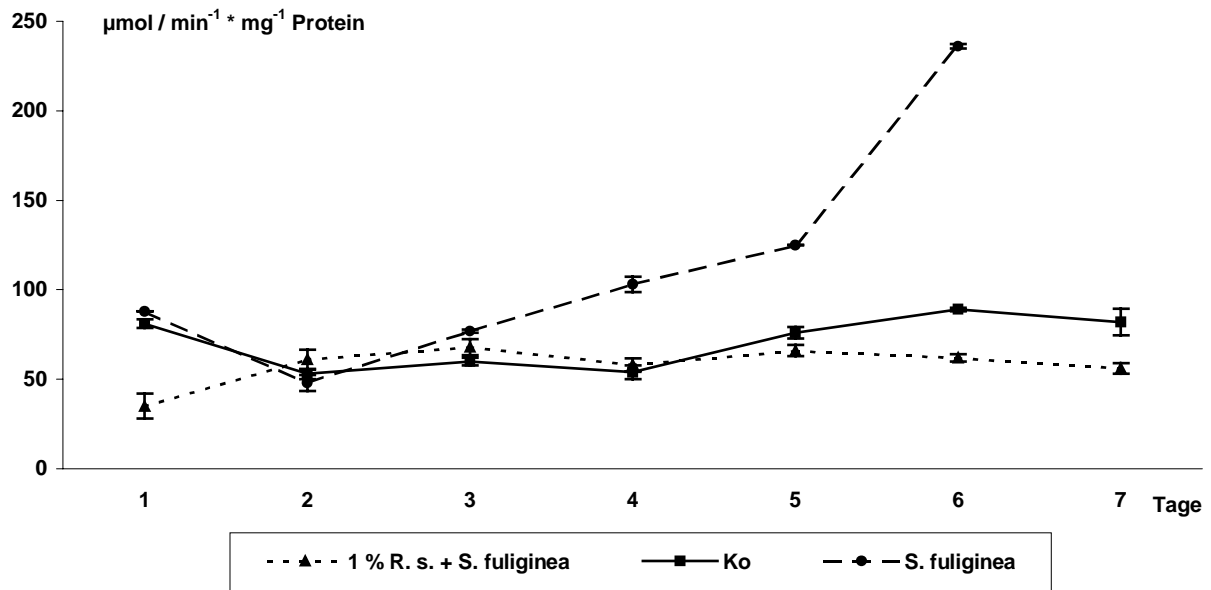


**Abb. 26 B:** Glutathionreduktase-Aktivität in mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stimulans (Cantharidin) behandelten Gurkenblättern 1 - 8 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* ( $n = 5$ ).

Eine Positivkontrolle mit externem  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte die bis zum achten Tag nach Inokulation zur Beseitigung der in der Pflanze vorliegenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration sich aufbauende GR-Aktivität. Bei Einsatz eines  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stimulans wie Cantharidin war dieser Verlauf abgeschwächt, d. h. eine ausreichend hohe GR-Aktivität wurde bis zum achten Tag vermutlich bei den so gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen nicht erreicht (Abbildung 26 B).

### 3.7.2.5 Glutathion-S-transferase

Erhöhte GT-Aktivität wurde im Anschluß an eine erhöhte GR-Reaktion erwartet und untersucht, da bekannt war, daß die Entstehungsprodukte einer GR-Reaktion in der Regel von GT weiterverarbeitet werden. Bei induzierten und inokulierten Gurkenpflanzen trat im Zeitraum von bis zu sieben Tagen im Vergleich zur Kontrolle keine erhöhte GT-Aktivität auf, wohl aber in nur mit *S. fuliginea* infizierten Pflanzen mit fortschreitender Mehltauentwicklung. Dabei wurden sechs Tage nach Inokulation ca.  $250 \mu\text{mol Substrat} / \text{min} \cdot \text{mg Protein}$  umgesetzt (Abbildung 27).



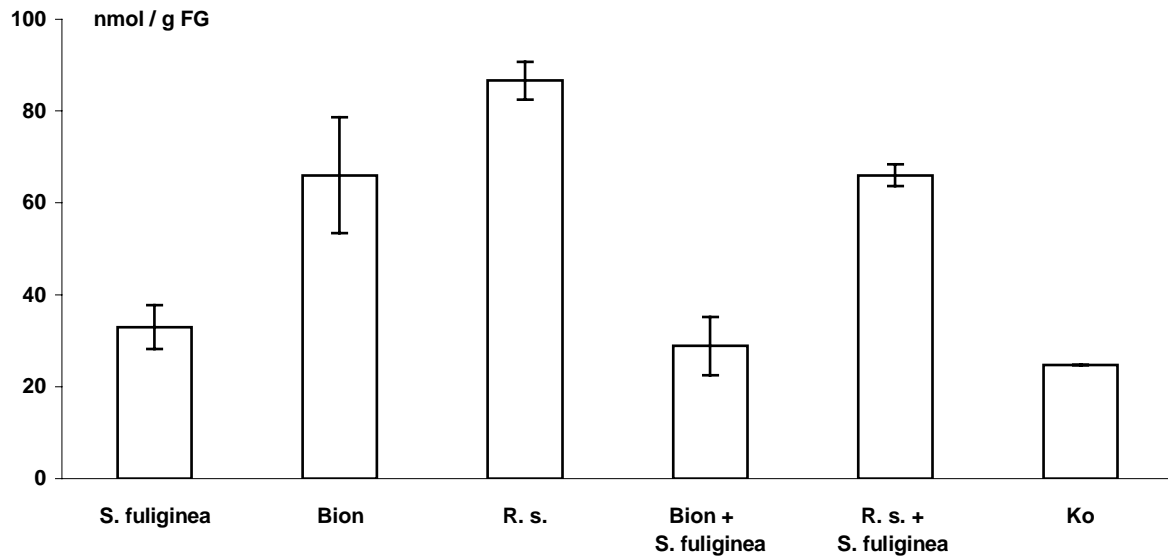
**Abb. 27:** Glutathion-S-transferase-Aktivität in mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) induzierten Gurkenblättern 1 - 7 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* (n = 5).

### 3.7.2.6 Chalkonisomerase

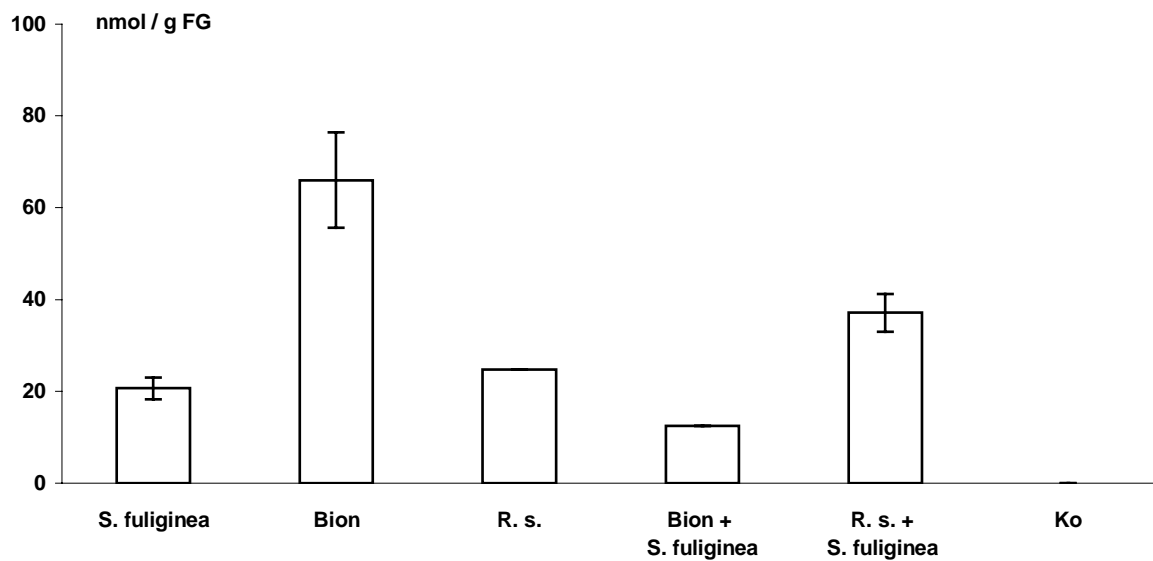
Mit Bion induzierte Gurkenpflanzen mit und ohne Mehltaubefall entwickelten erhöhte CHI-Aktivität im Zeitraum von ein bis sieben Tagen nach der Behandlung. Insgesamt aber waren die CHI-Aktivitäten sehr gering. Eine Induktion mit *R. sachalinensis*-Extrakt und anschließende Mehltauinfektion führten dagegen nur am ersten und zweiten Tag zu Aktivitätsänderungen (ohne Abbildung).

### 3.7.3 Enzymreaktionen im API-ZYM-System

Die Enzyme außerhalb des  $H_2O_2$ -Metabolismus wurden mit dem Testsystem API-ZYM semiquantitativ erfasst (Abbildung 28). Dabei handelte es sich um folgende Enzyme: Alkalische Phosphatase, Esterase, Esterase Lipase, Lipase, Leucin-Arylamidase, Valin-Arylamidase, Cystin-Arylamidase, Trypsin, Chymotrypsin, Saure Phosphatase, Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidase, N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase,  $\alpha$ -Mannosidase und  $\alpha$ -Fucosidase. Getestet wurden sowohl nur mit Induktoren behandelte Gurkenpflanzen als auch induziertes und inokuliertes Gewebe. Nach einem ersten Screening von insgesamt 19 verschiedenen Enzymen zeigten einige Enzymgruppen in keiner Versuchsvariante Aktivität. Zu diesen gehörten durchgehend die Gruppe der Trypsine,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\alpha$ -Glucosidase und  $\alpha$ -Fucosidase.



**Abb. 29:** Einfluß protektiver Spritzapplikationen von 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) und Bion (500  $\mu$ M) auf die Aktivität (nmol / g Frischgewicht) der Galactosidase in Gurkenblättern (n = 5).



**Abb. 30:** Einfluß protektiver Spritzapplikationen von 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) und Bion (500  $\mu$ M) auf die Aktivität (nmol / g Frischgewicht) der Glucosidase in Gurkenblättern (n = 5).



Eine verstärkte Aktivitätsänderung wurde für drei der Enzyme im Vergleich zur Kontrolle gefunden:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Galactosidase und  $\beta$ -Glucosidase. In mit *R. sachalinensis*-Extrakt oder Bion induzierten Gurkenpflanzen war  $\alpha$ -Galactosidase im Vergleich zur Kontrolle bis zu sieben Tage nach Induktion stark erhöht. Dabei wurde eine Substratumsetzung von ca. 66-86 nmol Substrat / g FG erreicht. Induktion in Kombination mit einer *S. fuliginea*-Inokulation hingegen hatte keine additiven Effekte, sondern reduzierte partiell diese Aktivität (Abbildung 29). Gleiches galt für  $\beta$ -Galactosidase (ohne Abbildung), deren umgesetzte Substratmenge bei Induktion der Pflanzen mit Extrakt oder Bion im Vergleich zur  $\alpha$ -Form viermal höher ausfiel. Nur mit *S. fuliginea* inokulierte Gurkenpflanzen zeigten eine wenn auch abgeschwächte Erhöhung der Enzymreaktion. Die Analyse der  $\beta$ -Glucosidase ergab ein ähnliches Bild, wobei hier die Enzymaktivität in der Kontrolle gänzlich fehlte. Im Gegensatz zur Galactosidase erreichte der Substratumsatz nach Induktion der Pflanzen mit Bion das höchste Niveau mit ca. 66 nmol Substrat / g FG (Abbildung 30).

### **3.8 Isoelektrische Fokussierung von Enzymen nach Induktorbehandlung**

#### **3.8.1 Aktivitätsnachweise von Glutathionreduktase und Glutathion-S-transferase**

Die isoelektrische Fokussierung erlaubt es, durch Detektion verschiedener Formen ein und desselben Enzyms, Proben von unterschiedlicher Herkunft miteinander zu vergleichen und ihre genetische Beziehung zueinander zu bestimmen. Die Ausbildung eines gleichmäßigen pH-Gradienten von pH 3 bis pH 10, die Grundvoraussetzung für die optimale und korrekte Auftrennung vorhandener Formen, konnte bei jedem Elektrophoreselauf durch Anlegen von Indikatorstreifen für diesen gesamten pH-Bereich auf einen Gelstreifen gesichert werden. Die Untersuchungen der Formen von GT und GR zeigten, daß nach Induktion der Gurkenpflanzen mit 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt über mehrere Stunden nur bei GT eine neue Form vorlag, die im pH-Bereich von 3,6 detektiert werden konnte (Abbildung 32). Diese war schon nach 2 h Inkubation im Extrakt aktiviert und ließ sich auch 10 h nach Induktion noch im Gel nachweisen. Zusätzlich hatten induzierte Gurken und Kontrollpflanzen drei weitere gemeinsame GT-Formen (pH 1,7 / pH 4,7 / pH 7,5).

### **3.9 Lokalisation von Enzymen im Gewebe nach Induktorbehandlung**

#### **3.9.1 Aktivitätsnachweise von Glucosidase und Galactosidase**

Die Aktivitätsfärbungen von Glucosidase und Galactosidase im Tissue Printing-Verfahren sollten die Ergebnisse aus Kapitel 3.7.3 vertiefen. Die Frage war, ob die Aktivitäten der beiden Enzymgruppen, die nicht direkt mit dem Auf- und Abbau von  $H_2O_2$  in Verbindung standen, auch im Gewebe lokalisiert werden können. Mittels der schon aufbereiteten API-ZYM-Proben wurden Dot-Blots angesetzt. Dabei wurden insbesondere die Varianten getestet, die stark erhöhte Aktivitäten im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle aufzeigten. In Pflanzen mit Extrakt- bzw. Bionanwendung im Zeitraum ein bis fünf Tage nach Applikation konnte mit dem spezifischen Substrat Glucosidase durch Blaufärbung angezeigt werden, Galactosidase mehr oder weniger violett. Kontrollen blieben gänzlich farblos, eine

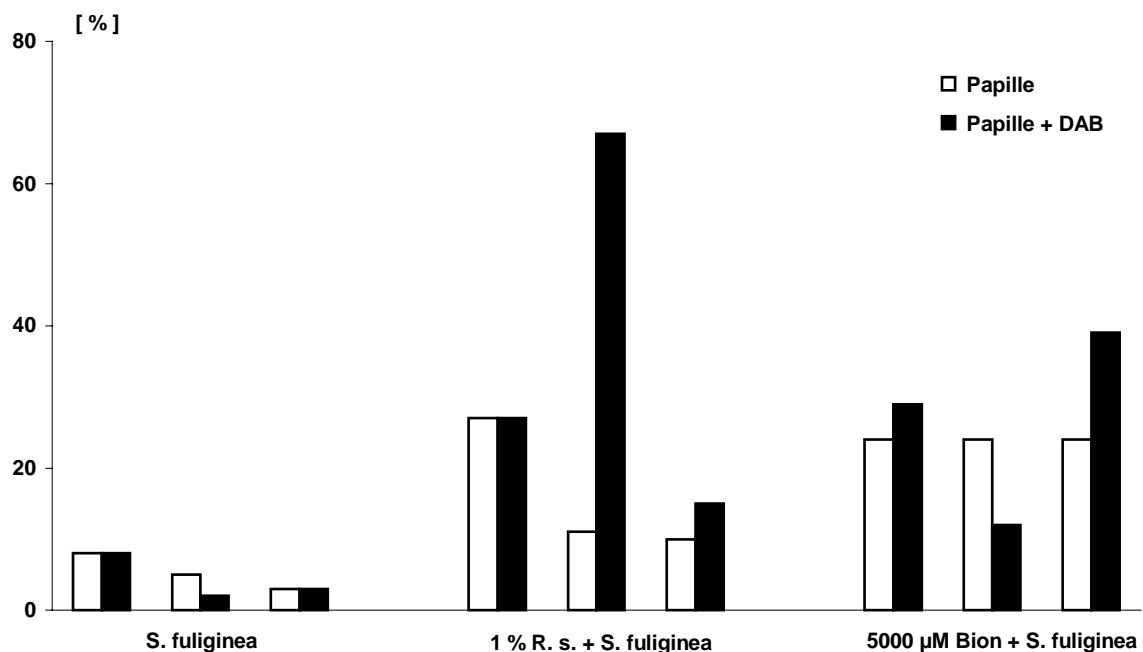
Hintergrundfärbung durch Autoxidation etc. konnte in keinem Fall beobachtet werden. Der Einsatz von ganzen oder halbierten Gurkenprimärblättern, die für 24 h in Extrakt oder Bion inkubiert worden waren, erbrachte eine deutliche Färbung. Quantitative Aussagen waren jedoch nicht möglich, da der Zusammenhang zwischen Farbtintensität und Enzymkonzentration nicht exakt genug bestimmt werden konnte.

### 3.10 Charakterisierung der Wirkung von Induktoren

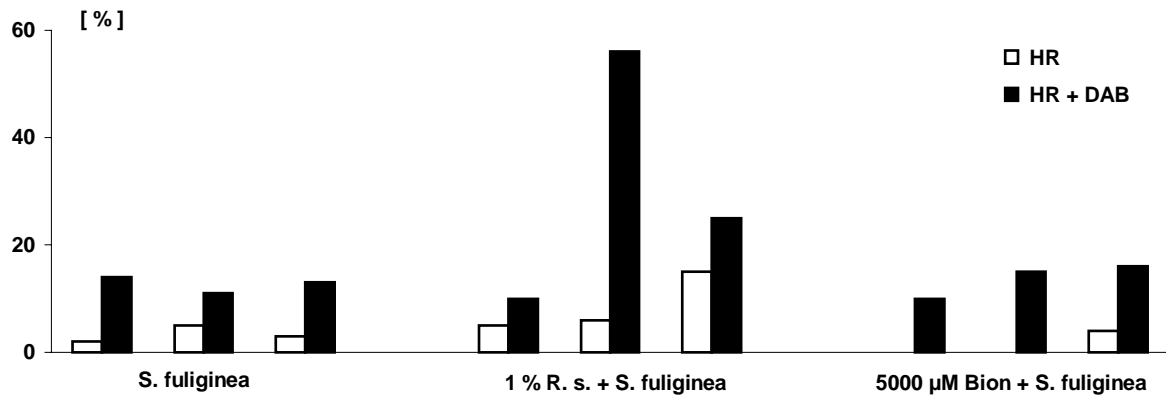
#### 3.10.1 Einfluß auf die Pilzentwicklung in Gurkengewebe

##### 3.10.1.1 Bildung effektiver Papillen und Hypersensitiver Reaktionen

Bei Betrachtung der Wirkung eines 1 % *R. sachalinensis*-Extrakts fiel auf, daß dieser 24 h nach Inokulation eine sehr starke Papillenbildung als Abwehrmechanismus induzierte, während zu diesem Zeitpunkt nur eine geringe Anzahl an HR-Zellen vorlag. 72 h nach Inokulation hatte sich dieses Erscheinungsbild zugunsten der Ausbildung von HR-Zellen verschoben. Auffallend war aber der relativ hohe Anteil an HR und Papillen mit  $H_2O_2$ -Akkumulation (spezifische DAB-Färbung) 48 h nach Inokulation. Applikation von 5000  $\mu M$  Bion hingegen induzierte zu allen Zeitpunkten mehr Papillen als HR-Zellen, durch die das Pathogen gestoppt wurde. Die relativ wenigen HR-Zellen wurden in den meisten Fällen mit DAB angefärbt (Abbildung 32 + 33).



**Abb. 32:** Anteil effektiver Papillen in mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) und Bion induzierten Gurkenblättern mit bzw. ohne  $H_2O_2$ -Detektion (DAB-Färbung) an der Gesamtzahl der untersuchten Infektionsstellen von *Sphaerotheca fuliginea* 1-3 Tage nach Inokulation (n = 50).



**Abb. 33:** Anteil HR-Zellen in mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) und Bion induzierten Gurkenblättern mit bzw. ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Detektion (DAB-Färbung) an der Gesamtzahl der untersuchten Infektionsstellen von *Sphaerotheca fuliginea* 1-3 Tage nach Inokulation (n = 50).

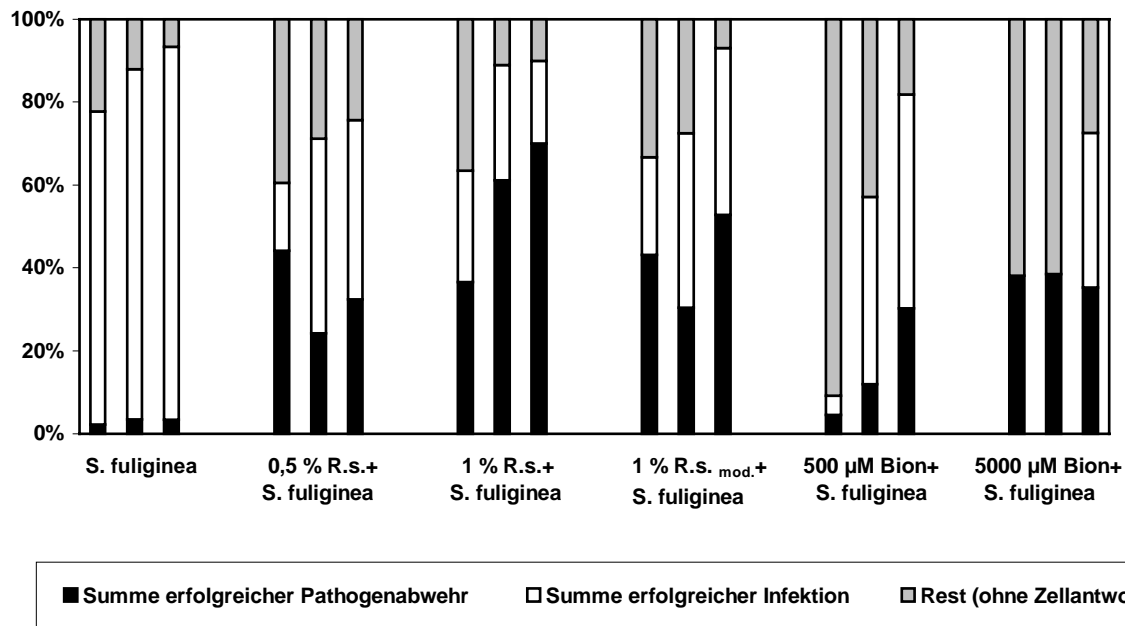
Die einzelnen Abwehrreaktionen der Epidermiszellen im Gurkenblatt fielen dabei in der Ausprägung unterschiedlich aus (Abbildung 34 A-C).

### 3.10.1.2 Pathogenbefall

Nach Extrakt-Behandlung wurde innerhalb der ersten drei Tage nach Inokulation nur sehr selten mehr als ein Haustorium je Hyphe ausgebildet. Die normal verlaufende Pathogenentwicklung (Kontrolle) umfaßte die Bildung von bis zu vier Haustorien an der primären Hyphe sowie die Bildung von weiteren Hyphen. Ebenso entwickelte sich ein Haustorium, obwohl z. T. schon eine Papillenbildung stattgefunden hatte. 24 h nach Induktion der Gurkenpflanzen mit dem Extrakt bildeten 27 % der Konidien mit appressorialem Keimschlauch ein Primärhaustorium aus. Danach reduzierte sich dies auf 5-10 %. Die Haustorien traten entweder mit oder ohne eine Papille auf. Die Etablierung des Pilzes war also nicht unbedingt durch die Ausbildung eines Haustoriums gesichert. Hier wurden nach Haustoriumbildung weitere Papillen an sekundären Hyphen gebildet. Bei einer Bion-Sprühapplikation ließ sich dieses in abgeschwächter Form erst nach 72 h beobachten (18 %). Die nur mit Mehltau inokulierten Pflanzen zeigten Primärhaustorienbildung frühestens 24 h nach Inokulation mit einer Bildungsrate von 58 %. Diese schwankte über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 h zwischen 40 % und 70 %.

### 3.10.1.3 Induktorprofile

Verglichen wurde der Prozentsatz erfolgreicher Pathogenabwehr mit erfolgreicher Infektion und dem Anteil an Zellen, die trotz Entwicklung eines appressorialen Keimschlauchs keine Zellantwort zeigten (Abbildung 35).



**Abb. 35:** Verteilung der Zellreaktionen von mit *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s., R.s. mod. = Spritzbelag entfernt) und Bion induzierten Gurkenblättern 1-3 Tage nach Inokulation mit *S. fuliginea* (n = 50-100).

*R. sachalinensis* bewirkte auf Gurkenpflanzen im Verlauf von drei Tagen eine Verringerung der Zellzahl ohne Reaktion (Rest) zugunsten erfolgreicher Pathogenabwehr. Im Gegensatz zu den Reaktionen von Gerstenprimärblättern unterschieden sich die Anteile an entwicklungsverzögerten Konidien und solchen, die keine sichtbare Zellantwort hervorgerufen hatten, stark von nicht-induzierten Pflanzen. Diese Entwicklung war bei Behandlung mit 1 % Extrakt ausgeprägter als bei geringeren Konzentrationen. Wurde der Spritzbelag des Extrakts vor Inokulation zur Minimierung einer direkten Wirkung auf die Konidien entfernt, blieb seine Wirkung gleich. Je höher dosiert Bion angewendet wurde, desto erfolgreicher war die Pathogenabwehr. Bei hoher Bionkonzentration (5000 µM) blieben ca. 61 % der Zellen am ersten und zweiten Tag nach Inokulation mit Mehltau ohne Reaktion. Wurde es schwächer dosiert (500 µM), entwickelten sich die Konidien weiter, so daß aus diesen fehlenden Zellantworten eine erfolgreiche Infektion wurde.

### 3.10.2 Einfluß auf die Pilzentwicklung in Gerstenkoleoptilen

Zur Prüfung der pflanzenstärkenden und resistenzinduzierenden Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts bei Monokotyledonen wurde die Pathogenabwehr am System Gerste / Echter Gerstenmehltau untersucht. Folgende Resistenzmechanismen der Gerste wurden dabei näher betrachtet: a) lokale Zellwandapposition (Papille), b) programmierter Zelltod (Hypersensitive Reaktion), c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung (oxidativer Burst).

### 3.10.2.1 Keimrate und Bildung appressorialer Keimschläuche

Zur Bestimmung der Keimrate wurden Konidien gezählt, die mindestens den primären Keimschlauch entwickelt hatten. Die Keimung war spätestens 24 h nach Inokulation abgeschlossen. Anhand der ermittelten Keimraten der einzelnen Varianten über den Beobachtungszeitraum von drei Tagen, die weitgehend konstant geblieben waren, konnte mit einem Verlust der KF nach einem Tag gerechnet werden. Die Keimrate der Kontrolle lag bei 75,4 %, die nach DCSA-Behandlung bei 70,7 % und nach *Reynoutria*-Extrakt-Applikation bei 65,6 %. Bis spätestens 24 h nach Inokulation war auch die Bildung appressorialer Keimschläuche abgeschlossen. Die Induktorvarianten unterschieden sich dabei nicht signifikant von der Kontrolle. Im Durchschnitt lag die Bildungsrate bei 65,6-71,2 %. Bereits auf die Ausbildung des primären Keimschlauches reagierte die darunterliegende Epidermiszelle sofort mit Cytoplasmaströmung und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation, die in allen Varianten anhand von DAB-Färbungen unter den primären Keimschläuchen zu beobachten waren. Auch schon vor Papillenausbildung waren diese DAB-Polymere unter den Appressorien zu sehen.

### 3.10.2.2 Pathogenabwehr durch Bildung effektiver Papillen

Nach Ausbildung des appressorialen Keimschlauches nahm die Cytoplasmaströmung in der Epidermiszelle zum Penetrationsort hin zu. Innerhalb dieser Zelle zeigten sich bereits nach 20 h erste Papillenstrukturen als hyaline Kreise, die noch nicht autofluoreszierten. Diese jungen Papillen waren erkennbar, sobald sie im Durchmesser größer als der appressoriale Keimschlauch waren. Die Papillen aller Varianten durchliefen eine Papillengenese von hyalinen, hellen Papillen mit schwacher Autofluoreszenz hin zu dunkleren mit starker Autofluoreszenz (Abbildung 36). Die Papillenstruktur aller Varianten zusammengefaßt zeigte, daß 24 h nach Inokulation ca. doppelt so viele helle wie dunkle Papillen auftraten (1,83:1), 48 h nach Inokulation hingegen waren nur noch halb so viele helle wie dunkle Papillen zu verzeichnen (0,57:1). Der Anteil der Papillen an den Infektionsstellen, d. h. an Konidien, die einen appressorialen Keimschlauch ausgebildet hatten, war im Vergleich zwischen Kontrolle und Induktoren im Mittelwert der drei Beobachtungstage signifikant unterschiedlich. Die Papillenrate nach DCSA-Behandlung lag bei 48,8 %, die nach Extrakt-Applikation bei 35,3 % (Kontrolle 24,1 %). Wurde der Penetrationsversuch durch eine effektive Papille abgestoppt, bildeten einige Konidien für einen weiteren Penetrationsversuch eine Schlaufe ("lobe") als Verlängerung des appressorialen Keimschlauchs aus. Entsprechende sekundäre Papillen konnten 48 h nach Inokulation registriert werden. Nach Induktorapplikation kam es nur in 1,8 % der Fälle zu diesem zweiten Penetrationsversuch (Kontrolle 8,2 %). DAB-Polymerbildung wurde an effektiven Papillen beobachtet. Eine leichte DAB-Anfärbung der Papillenstruktur entsprach 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, eine tiefbraune Färbung der Papille, die einen mehr oder weniger großen Hof bzw. Ring um die Papille mit einschloß, spiegelte eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 1-10 µmol wider. Alle Varianten, die Kontrolle ausgeschlossen, zeigten eine Zunahme und Intensivierung der DAB-Färbung nach der Inokulation. Dabei

stieg der Anteil der mit DAB angefärbten Papillen von 65 % (24 h nach Inokulation) auf über 80 % (72 h nach Inokulation) an. Signifikante Unterschiede lagen dabei nur absolut vor.

### **3.10.2.3 Erfolgreiche Infektion**

Nach einer erfolgreichen Penetration des Mehltaus in die Epidermiszelle begann die Entwicklung des primären Haustoriums. Zwanzig Stunden nach Inokulation war eine kleine, runde Haustoriumsinitiale zu beobachten, die sich langsam vergrößerte. Die volle Entwicklung des Haustoriums bis zur Bildung der fingerförmigen Fortsätze dauerte bis ca. 30 h nach Infektion an. 72 Stunden nach Inokulation zeigten Kontrollpflanzen ca. 51 %, Extrakt-behandelte ca. 39 % (nicht signifikant) und DCSA-behandelte Gerstenpflanzen ca. 19 % (signifikant) erfolgreich etablierte Konidien. In allen drei Varianten nahm im Zeitverlauf der Anteil erfolgreich etablierter Konidien zu. Sowohl in der Kontrolle als auch nach einer Extrakt-Behandlung waren diese Zunahmen signifikant.

### **3.10.2.4 Infektionsstellen ohne sichtbare Zellantwort und ohne Haustoriumbildung**

Zu dem Anteil der Konidien, deren weitere Entwicklung durch die Bildung einer effektiven Papille abgestoppt wurde, und dem Anteil der erfolgreichen Konidien kam ein relativ hoher Anteil an Konidien, die bis zum appressorialen Keimschlauch gekeimt waren, sich aber nicht weiter entwickelten, also kein Haustorium bildeten. Zudem war keine sichtbare Zellantwort zu erkennen. 24 h nach Inokulation lag dieser Prozentsatz in DCSA- und Extrakt-behandelten Pflanzen und in der Kontrolle im Durchschnitt bei ca. 37-41 %, weitere 48 h später war dieser hohe Anteil bis auf ca. 21 % bei Extrakt-behandelten Pflanzen gesunken (ohne Abbildung).

### **3.10.3 Einfluß auf die Pilzentwicklung in Gerstenprimärblättern**

Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an Gerstenprimärblättern umfaßten eine Beobachtung der Interaktion zwischen kurzen Epidermiszellen des A- und B-Typus und Mehltaukonidien auf der Blattoberfläche von sieben Tage alten Pflanzen der Sorte "Pallas", die zuvor mit verschiedenen Induktoren behandelt worden waren. Die einzelnen Reaktionen wurden an 50 Konidien pro Blattsegment ausgezählt.

#### **3.10.3.1 Direkte Wirkungen des *Reynoutria*-Extrakts**

In den mit 1 % *Reynoutria*-Extrakt behandelten Pflanzen wiesen 55,6 % der gekeimten Konidien eine Fehlentwicklung des appressorialen Keimschlauches auf. Statt eines kurzen, zur Epidermiszelle gekrümmten Keimschlauches mit einem verdickten Appressorium wuchsen die Keimschläuche lang und dünn von der Epidermisoberfläche weg, ohne ein funktionelles Appressorium auszubilden. Bei Entfernung des Extraktbelages verblieb eine Fehlkeimungsrate von ca. 13,1 %. Die Berechnung der Raten an effektiver Papillenbildung, HR und Pathogenbefall wurden hier jedoch auf normal gekeimte, d. h. echte Penetrationsversuche bezogen.

### 3.10.3.2 Pathogenabwehr durch Bildung effektiver Papillen

Die Bildung effektiver Papillen stoppte den Infektionsprozeß im Stadium der Penetration und war 24 h nach Inokulation beendet. Zu jedem späteren Zeitpunkt traten nur noch geringe Modifikationen an den Papillen, wie Auflagerung oder Inkrustierung von Polyphenolen auf, die die Autofluoreszenz der Papillen erhöhten. Insgesamt war an den Blattsegmenten keine so deutliche Papillengenese wie im Koleoptilensystem zu verfolgen. Die Kontrolle wies ca. 39,6 % effektive Papillen auf. Alle anderen Varianten zeigten eine signifikant häufigere Papillenbildung (Bion 48,4 %; DCSA 48 %;  $R_{mod.}$  59,4 %). Der Anteil dieser effektiven Papillen blieb über 72 h relativ konstant. In der Intensität der DAB-Färbung der Papillen zeigten sich Unterschiede. Die Papillen konnten von schwach braun bis tiefbraun angefärbt sein. Zusätzlich konnte ein brauner Ring um die Papille mit unterschiedlichem Durchmesser auftreten (Abbildung 37). Von allen Varianten zeigte  $R_{mod.}$  den höchsten Prozentsatz DAB angefärbter Papillen von der Gesamtsumme an effektiven Papillen. Der Prozentsatz nahm im Zeitverlauf von 24 h bis zu 72 h nach Inokulation von 76,6 % auf 52,1 % ab. Sowohl eine DCSA- als auch eine Bion-Behandlung hatten dagegen keine vermehrte DAB-Papillenbildungsrate im Vergleich zur Kontrolle zur Folge.

### 3.10.3.3 Pathogenabwehr durch Hypersensitive Reaktion

Zellen, die eine Hypersensitive Reaktion durchliefen, konnten nur mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Hierbei fluoreszierte der gesamte Zellkörper gelblich. Dies wurde durch eine DAB-Färbung des Zelllumens überdeckt, die aber ebenso charakteristisch war und als ein Zeichen der HR gewertet werden konnte (Abbildung 38). In der Kontrolle zeigten Zellen unter gekeimten Konidien 24 h nach Inokulation einen HR-Anteil von 16,6 %. Demgegenüber hatten die Varianten der chemischen Induktoren Bion und DCSA einen signifikanten und doppelt so hohen Anteil an Zellen mit Hypersensitiver Reaktion (Bion 25,2 %; DCSA 30,7 %). Die modifizierte *Reynoutria*-Variante verstärkte das Auftreten von HR nicht (17,8 %). In einem Teil der Zellen, die HR durchliefen, ging der Zelltod mit einer starken DAB-Färbung einher.  $H_2O_2$ -Anfärbung ganzer Zellen trat 24 h nach Inokulation am häufigsten auf und überlagerte die Autofluoreszenz der abgestorbenen Zellen. In den meisten Fällen war auch eine Anfärbung der darunter liegenden Mesophyllzellen erkennbar. Bion- und DCSA-behandelte Pflanzen ließen keine DAB-Färbung signifikant unterschiedlich zur Kontrolle erkennen, während in der Variante  $R_{mod.}$   $H_2O_2$  in den HR-Zellen signifikant häufiger und konstanter verzeichnet werden konnte als in den Behandlungen mit synthetischen Induktoren und in der Kontrolle. Hier waren 48 h nach Infektion 71,2 % und 72 h nach Infektion 51,5 % der HR-Zellen braun gefärbt.

### 3.10.3.4 Pathogenbefall

Der Pathogenbefall ist über die Anzahl sich erfolgreich etablierender Konidien definiert. Ab der Penetration des Erregers in die Epidermiszelle und der darauffolgenden Entwicklung

des Primärhaustoriums galten Konidien als erfolgreich etabliert. In der Kontrolle bildeten durchschnittlich 35 % der Konidien mit appressorialem Keimschlauch ein Haustorium aus. Ab 24 h nach Inokulation war keine Zunahme mehr festzustellen. Im Gegensatz dazu nahm in den mit Induktoren behandelten Varianten innerhalb von 72 h der Anteil sich erfolgreich etablierender Konidien tendenziell zu. Die Rate lag drei Tage nach Bion-Behandlung bei 10,8 %, nach DCSA-Gießapplikation bei 18,2 % und nach  $R_{mod.}$ -Applikation bei 19,1 %.

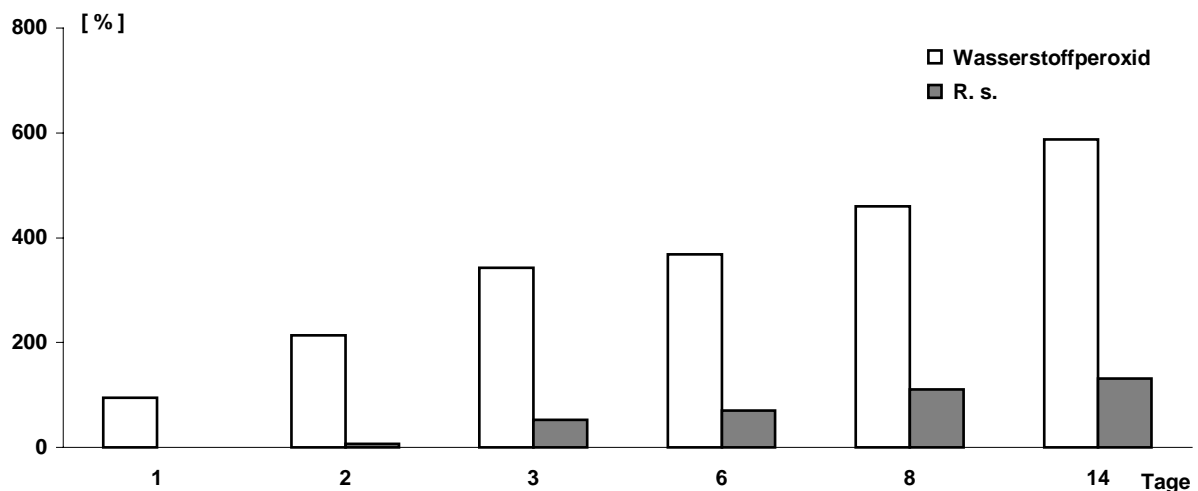
### 3.10.3.5 Infektionsstellen ohne sichtbare Zellantwort und ohne Haustorumbildung

Generell ließ sich beobachten, daß sowohl in der Kontrolle als auch in den Induktorvarianten der Anteil an Konidien mit appressorialem Keimschlauch, unter dem kein Haustorium und keine sichtbare Zellantwort zu erkennen war, über den Zeitverlauf tendenziell abnahm. Eine Bion-Applikation hatte mit 18,3 % den höchsten Anteil in ihrer Entwicklung gestoppter appressorialer Keimschläuche.

### 3.10.4 Einfluß auf das Gurkenpflanzengewebe

#### 3.10.4.1 Quantifizierung toter Zellen

In Ergänzung zu den makroskopisch auswertbaren, qualitativen Färbungen wurde die quantitative Erfassung von lebendem und totem Gewebe bei Gurken mit einem Farbstoff, der eine hohe Bindungsaffinität zu abgestorbenem Cytoplasmprotein hat, durchgeführt.



**Abb. 39:** Einfluß einer Behandlung mit Wasserstoffperoxid (2000 ppm) und 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R.s.) auf die Zunahme der Anzahl toter Zellen in Gurkengewebe gegenüber der Wasserkontrolle (Basis, n = 3).



Durch zunehmende Nekrotisierung von Gurkengewebe nach Applikation von Wasserstoffperoxid stieg die Menge an aufgenommenem Letalfarbstoff im Zeitraum von 14 Tagen nach Behandlung im Verhältnis zur Kontrolle auf das fast 600fache an (Abbildung 39). Die Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts war im Vergleich zu der von reinem Wasserstoffperoxid nur gering und vergleichbar mit den Ergebnissen der histologischen Auswertungen. Hier wurde lediglich nach zwei Wochen eine Erhöhung der Aufnahme von Letalfarbstoff um das ca. 100fache im Vergleich zur Kontrolle erreicht. Dieses schwache Vorkommen toter Zellen (14. Tag) könnte mit der makroskopisch sichtbaren Anfärbung lokaler Nekrosen mit Evans Blue zehn Tage nach punktförmiger Applikation des Extrakts übereinstimmen.

#### 3.10.4.2 Vitalität und Nekrotisierung von Zellen

Die Frage, ob es sich wegen fehlender lokaler Läsionen bzw. Nekrosen nach Induktion von Gurkenpflanzen mit dem *R. sachalinensis*-Extrakt nicht um eine typische, sondern um eine HR handelt, die makroskopisch symptomlos bleibt, wurde histologisch bearbeitet. Hierzu dienten Vitalfarbstoffe und spezifische Farbstoffe für absterbende bzw. tote pflanzliche Zellen (Letalfarbstoffe). Der Einsatz von zwei unterschiedlichen Vitalfarbstoffen zeigte folgendes Bild: nach 1-6 h Inkubation von Gurkenblättern mit dem *R. sachalinensis*-Extrakt, d. h. im Zeitraum bis zum oxidativen Burst, färbten sich makroskopisch erkennbar nur das Adernsystem teilweise (1 h Inkubation) und vereinzelte Epidermiszellen (= Spots) mit Methylenblau oder Neutralrot. Negativkontrollen wiesen eine ganzflächige Rot- bzw. Blaufärbung auf. Externe  $H_2O_2$ -Gaben als Positivkontrollen führten im Verlauf der 6 h Behandlung zu einer Abnahme der Färbung, wobei zuerst einzelne Spots, dann Epidermiszellwände und schließlich die gesamte Blattfläche farblos wurde. Applikation der Farbstoffe auf Blätter lieferte ein ähnliches Bild, aber verzögert, d. h. bei einer Positivkontrolle konnte erst nach 96 h zwischen toten und lebenden Zellbereichen unterschieden werden (Abbildung 40). Mit den Letalfarbstoffen war nach bis zu 6stündiger Einwirkung von *R. sachalinensis*-Extrakt auf Gurkengewebe ebenso wie bei der Negativkontrolle kein Zelltod nachweisbar. Im Gegensatz dazu verfärbte sich bei der Positivkontrolle mit 2000 ppm  $H_2O_2$  schon nach 1 h das Gewebe bläulich, was sich in den darauffolgenden Stunden noch verstärkte. Punktförmig eingesetztes externes  $H_2O_2$  (2000 ppm) wirkte direkt letal. Die erkennbaren blauen Flecken waren mit den Stellen der aufgesetzten  $H_2O_2$ -Tropfen identisch und 24 h nach Behandlung makroskopisch gut sichtbar. Die Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts hingegen war nach 48 h nur mikroskopisch und erst nach zehn Tagen makroskopisch sichtbar (Abbildung 41). Eine eindeutige Zuordnung zur punktförmig gesetzten Applikation war nicht möglich. Ob infizierte Zellen von der Nekrose betroffen waren, wurde nicht untersucht. Ein Vergleich der Ergebnisse zwischen Vital- und Letalfarbstoffen läßt vermuten, daß die Markierung toter Zellen spezifischer ist. Wenige tote Zellen, angefärbt zwischen ungefärbten Zellen, sind leichter zu erkennen als umgekehrt. Generell erreichten beide Farbstoffgruppen nach Auftragen ihren Wirkungsort später als nach Infiltration und Inkubation. Die langsamer einsetzende und spezifischer wirkende

Anfärbung von totem Zellmaterial könnte darauf beruhen, daß Zellen erst als Reaktion auf die Behandlung der Pflanze abgestorben sind, während vitales Gewebe ohne Veränderung vorlag. Die Ergebnisse mit Letalfarbstoffen erschienen daher insgesamt aussagekräftiger.

### **3.10.5 Beteiligung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe an der Induzierten Resistenz**

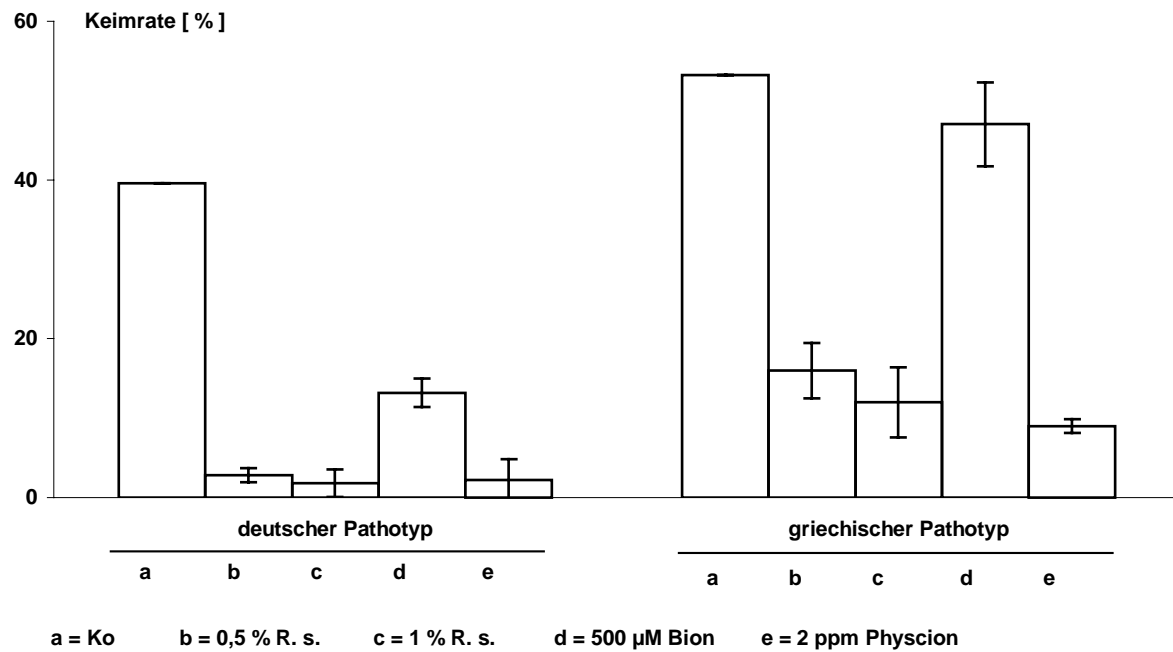
Die Untersuchungen von möglichen beteiligten Pflanzenstoffen an der induzierenden Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts beschränkte sich hier auf eine bestimmte Stoffgruppe, festgelegt durch das zum Einsatz gekommene spezielle Farbreagenz DMAZA. Nach den eigenen Beobachtungen war der Spritzbelag des *R. sachalinensis*-Extrakts nach Anwendung des Farbreagenz DMAZA blau gefärbt, was ein Vorhandensein von Flavanolen auf der Blattoberfläche anzeigte. Möglich wäre es, daß diese Flavanole im Extrakt selbst enthalten oder nach Induktion entstanden sind. Mit *R. sachalinensis*-Extrakt induzierte Gurkenpflanzen, die anschließend mit *S. fuliginea* inokuliert worden waren, zeigten vier Tage danach inner- und außerhalb des Spritzbelagbereiches ungekeimte Konidien mit blauer Färbung, z. T. färbte sich auch das darunter liegende Blattgewebe. Sekundäre Pilzhyphen zeigten hingegen keine Verfärbung.

### **3.10.6 Sonstige Einflüsse auf die Ausbildung der Induzierten Resistenz**

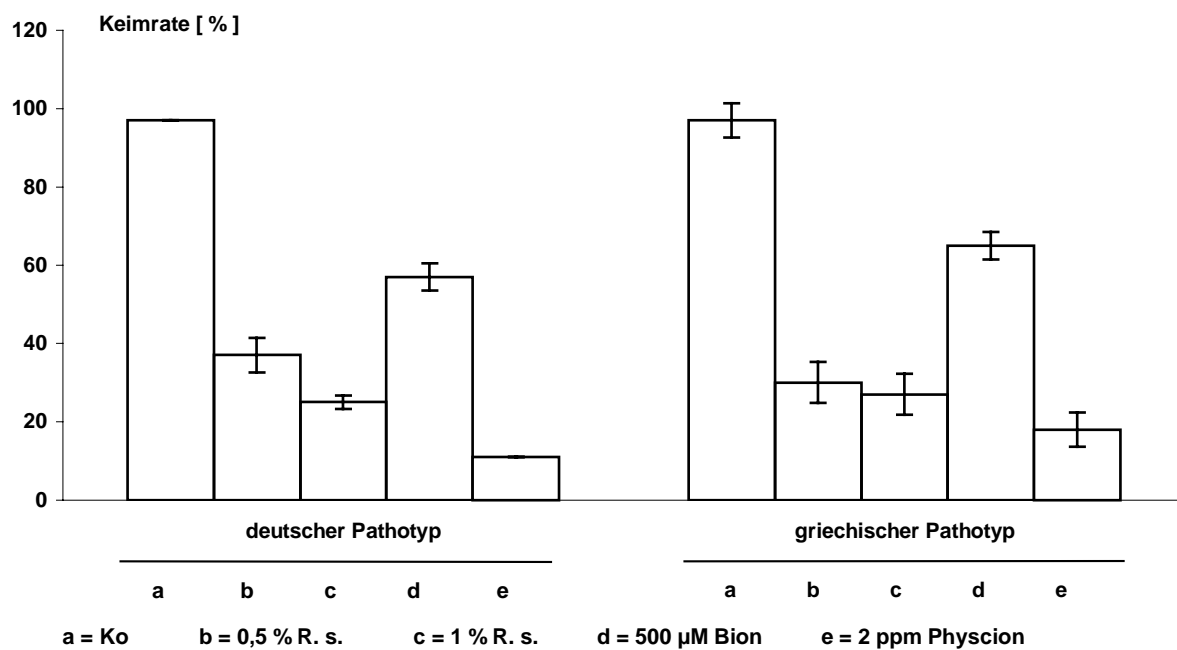
#### **3.10.6.1 Keimfähigkeit und Keimverzögerung von *S. fuliginea*-Sporen**

Die prozentualen Keimraten von zwei unterschiedlichen Mehltaurassen 24 h nach Inokulation der Gurkenpflanzen ließen deutlich die generell größere Fitneß des Pathotyps mit Herkunft Griechenland und dementsprechend auch die höhere Keimfähigkeit seiner Konidien nach verschiedenartiger Induktorbehandlung erkennen. Auffällig war die anfangs nahezu vollständige Keimungshemmung der deutschen Rasse durch *R. sachalinensis*-Extrakt bzw. Physcion trotz der üblichen dreitägigen Wartezeit zwischen Induktorapplikation und Ausbringung des Pathogens (Abbildung 42 A).

96 h nach Inokulation hatten sich beide Keimungsraten erhöht und einander angeglichen. Bei einem 0,5 % Extrakt waren zu diesem Zeitpunkt bei beiden Mehltaurassen ca. ein Drittel aller Konidien gekeimt, vergleichend dazu bei mit Bion behandelten Konidien 57-65 % (Abbildung 42 B). Im Beobachtungszeitraum von 48 h bis 72 h nach Inokulation zeigte sich, daß die Keimungshemmung durch den Extrakt kontinuierlich abnahm (ohne Abbildung).



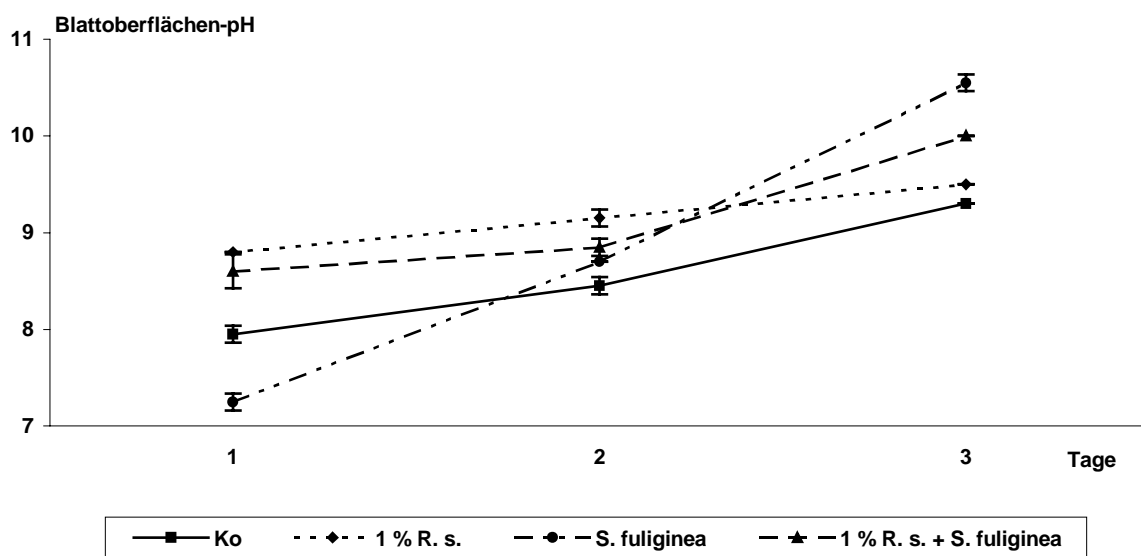
**Abb. 42 A:** Wirkung von *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R. s.), Physcion und Bion auf die Konidienkeimung zweier *Sphaerotheca fuliginea*-Pathotypen (deutsch = Darmstadt, griechisch = Patras) 24 Stunden nach Inokulation (n = 5).



**Abb. 42 B:** Wirkung von *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (R. s.), Physcion und Bion auf die Konidienkeimung zweier *Sphaerotheca fuliginea*-Pathotypen (deutsch = Darmstadt, griechisch = Patras) 96 Stunden nach Inokulation (n = 5).

### 3.10.6.2 Änderungen des pH-Milieus auf Blattoberflächen

Der pH-Wert diene als Indikator für die Blattoberflächenmikroökologie. Dabei wurde untersucht, ob die etwaigen Änderungen des Milieus, die unmittelbar durch die Induktorbehandlung hervorgerufen wurden, die nachfolgende Entwicklung des Pathogens beeinflussen. Eine Applikation von *R. sachalinensis*-Extrakt erhöhte im Vergleich zur wasserbehandelten Kontrolle (pH 8,0) den pH-Wert auf 8,8, wobei diese Wirkung nicht die des wässrigen Extrakts *per se* war, da dessen pH bei 5,5 lag (Abbildung 43). Inokulierte Pflanzen zeigten mit fortschreitender Pathogenentwicklung über einen Zeitraum von drei Tagen nach der Inokulation einen Anstieg des pH bis hin zu Extremwerten von 10,5. Bei zuvor induzierten Pflanzen glich sich drei Tage nach Infektion der pH der Blattoberfläche dem von nur infizierten Gurkenpflanzen langsam an. Dies deutet darauf hin, daß bei Pilzbefall generell ein stärkerer pH-Anstieg zu verzeichnen ist. Dieser fiel bei vor der Inokulation induzierten Gurkenpflanzen geringfügig schwächer aus, wobei auch der Befall durch die Extraktbehandlung abgeschwächt wurde.



**Abb. 43:** Einfluß protektiver Spritzapplikationen von *R. sachalinensis*-Extrakt (R. s.) auf den pH-Wert der Blattoberflächen von Gurkenblättern nach 1-3 Tagen (n = 5).

## 4 Diskussion

Genau wie resistente Sorten einer Pflanze zu Anfang entwickelt worden sind, ohne ausreichende Kenntnis darüber, welche biochemischen und physiologischen Reaktionen für die vorliegende Resistenz verantwortlich gemacht werden können, so wurden zur Erforschung der Induzierten Resistenz Substanzen, genannt **Induktoren**, eingesetzt, die erhebliche Unterschiede in der Wirkung als solche aufweisen. Um Resistenz zu induzieren, müssen Induktoren prophylaktisch ausgebracht werden, da kurative Effekte wegen der nicht vorhandenen antimikrobiellen Wirkung ausgeschlossen sind. Die Kenntnis der einzelnen Wirkungsmechanismen kann zum Verständnis für die auftretenden Effekte sehr beitragen und somit eine wirkungsvollere Anwendung ermöglichen. Die Experimente zur Aufklärung der **Signaltransduktionskette** sollten sowohl Fragen zum Mechanismus früher pflanzlicher Verteidigung nach Resistenzinduktion beantworten, durch Klärung der Beteiligung von Enzymen des Oxidationsschutzes, als auch spezifischer, später einsetzender Abwehrreaktionen wie der Bildung fungizider Inhaltsstoffe in induzierten Pflanzen und der Lokalisation chemischer und mechanischer Barrieren (Baker & Orlandi 1995) wie Papillenbildung (Kogel et al. 1994) und Hypersensitive Reaktion. Es wurde vermutet, daß einzelne Glieder der Signalkette beim Induktor ***Reynoutria sachalinensis*-Extrakt** und dessen Wirkbestandteil **Physcion** von denen anderer Induktoren (**DCINA, DCSA, Bion**) abweichen, da *R. sachalinensis* und Physcion gegenüber Mehltau bei der Gurke nur lokal, z. B. Bion aber systemisch wirkt. Aus einem Vergleich der genannten biologischen und chemischen Induktoren sollten Charakteristika dieser Induktionsketten untersucht werden, wobei die Untersuchungen insbesondere Aufschluß über Unterschiede in der Ausbreitung der Resistenz bzw. über Gemeinsamkeiten und Unterschiede geben sollten.

### 4.1 Entstehung und Rolle des oxidativen Burst

In vorangegangenen Arbeiten zur induzierenden Wirkung von *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt und dessen Wirkbestandteil Physcion wurde schon vermutet, daß die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eine wesentliche Bedeutung hat. Es existieren zwei Vorstellungen über Stoffwechselwege, die als Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies beim sogenannten **oxidativen Burst** in Frage kommen: a) das NADPH-Oxidase-System und b) die pH-abhängige Bildung von  $H_2O_2$  durch extrazelluläre Peroxidasen (Bolwell & Wojtaszek 1997; Stich & Ebermann 1984). Der in vielen Systemen nachgewiesene oxidative Burst nach Behandlung mit einem Elicitor, Induktor oder Pathogen beinhaltet in der Regel eher die Aktivierung schon vorhandener Oxidase-Komponenten als eine *de novo*-Synthese von Enzymen des oxidativen Burst-Mechanismus (Alvarez & Lamb 1997). Zur Klärung der Frage nach der Herkunft von vermehrtem  $H_2O_2$  sollten die einzelnen Enzymreaktionen betrachtet werden, d. h. ob hauptsächlich Enzyme aktiviert werden, die an der  $H_2O_2$ -Bildung beteiligt sind oder solche, die in der Pflanze als Produzenten von Antioxidantien fungieren und nach Induktorbehandlung stark gehemmt werden. Nach der Literatur gibt es eine große Anzahl von Versuchsanordnungen, welche einen oder mehrere oxidative Bursts

hervorbringen. Elicitorbehandelte Sojabohnenzellen erreichen z. B. eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 1,2 mM innerhalb von 10 min, wobei zwei getrennte Bursts auftreten. Kalix (1996) berichtete über eine erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion in *Nicotiana tabacum* 45 min nach Induktorzugabe. Die mit DCINA, DCSA und Bion behandelten Blätter unterschieden sich dabei nicht in einer vermehrten oder verminderten Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hypokotylsegmente von *Cucumis* spp. wurden bei Svalheim & Robertsen (1993) mit  $\alpha$ -1,4-verknüpftem Elicitor (Oligo-1,4- $\alpha$ -D-Galakturonid) behandelt und danach konnte ein Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration 2 h später festgestellt werden. Dieser Wert stieg kontinuierlich bis zwölf Stunden nach Behandlung an, um dann nach weiteren 12 h auf den Ausgangswert zurückzugehen. Phosphatase-Inhibitoren konnten in diesem System dann in Abwesenheit von Oligogalacturonid die Induktion eines oxidativen Bursts nachahmen. Wie in den eigenen Untersuchungen wurde darauf hin vermutet, daß die Induktion durch Oligogalacturoniden durch eine Verschiebung im Phosphorylierung-Dephosphorylierungs-Gleichgewicht herbeigeführt wurde. Die Frage nach der Funktion einer derartigen Erhöhung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration konnte nicht allgemeingültig beantwortet werden. Es wurde u. a. vermutet, daß es direkt zur Abwehr von Schaderregern, als "second messenger" zur Auslösung von Resistenzmechanismen oder auch als Substrat für Lignifizierungsreaktionen genutzt werden könnte. Häufig wird eine Akkumulation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch als ein lokaler Schwellenauslöser für den programmierten Zelltod und als ein Verbreitungssignal für die Induktion von antioxidativen Schutzsystemen angesehen. Der Burst kann zeitlich zwischen den frühen Ereignissen wie der Stimulation des Ionenstromes durch die Plasmamembran und der späteren Änderung bei der Genexpression eingeordnet werden. Ádám et al. (1989) beobachteten in mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induzierten Tabakpflanzen eine vermehrte Produktion von  $\text{O}_2^-$ . In den eigenen Untersuchungen konnte ebenfalls in mit Extrakt induzierten Gurken eine Anreicherung von Superoxidanionen zu einem sehr frühen Zeitpunkt beobachtet werden, wobei sich diese vermehrte Bildung zeitlich bis hinein in den oxidativen Burst ausdehnte. Auch die von Doke (1983) durchgeführten Experimente an Kartoffeln zeigten eine Superoxidradikalbildung nach Induktion systemischer Resistenz gegenüber *Phytophthora infestans* und eine enge Korrelation zum Aktivitätsanstieg eines Enzyms des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Metabolismus (SOD). Generell vermuteten Levine et al. (1994) und Dempsey & Klessig (1994) die Funktion von Sauerstoffradikalen in der Signalwirkung, genau wie Salicylsäure und Jasmonate (Staswick 1992; Wasternack et al. 1994). Die schnelle Bildung von  $\text{O}_2^-$ -Radikalen im Pflanzengewebe könnte auch eine Folge der Infektion mit Pathogenen sein. Den bekanntesten Sauerstoff-Formen wird eine ursächliche Beteiligung am hypersensitiven Zelltod infizierter Pflanzenzellen zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß die Induktion der systemischen Resistenz in Kartoffeln gegenüber *Phytophthora infestans* mit der Aktivierung der  $\text{O}_2^-$ -Radikalbildung assoziiert ist (Chai & Doke 1987).

#### 4.2 Bedeutung von Radikalfängern und Proteinkinase-Inhibitor

Wie aus der Literatur bekannt, fungiert die Gruppe der C- und E-Vitamine als Radikalfänger. **Ascorbinsäure** kann sowohl radikale O-Verbindungen (Vorstufen) als auch toxische Endprodukte entgiften. Dieses kann sie über die Ascorbat-Peroxidase regeln, wobei Ascorbat durch Dehydroascorbatreduktase auf Kosten von Glutathion wieder regeneriert werden kann (Baker et al. 1995). Desweiteren haben beide Radikalfänger aufgrund des Vergleichs des Ausbringungsverfahrens ihren Wirkort bzw. das betreffende zelluläre Kompartiment, in dem freie Radikale produziert werden, erreichen können. Eine Voraussetzung für die effektive Schutzwirkung von antioxidativen Systemen ist, daß der Scavenger zur richtigen Zeit am richtigen Ort eine geeignete Konzentration erreicht, um einen Großteil der schädigenden Radikale abfangen zu können (Madamanchi & Alscher 1991). Da die gemessenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen nach Behandlung von Gurken mit einem 1 % Extrakt sehr hoch waren, könnte das weniger erfolgreiche Abfangen der Wirkung eines derart hoch konzentrierten Extrakts gegenüber einem 0,1 % Extrakt in einem unausgewogenen Konzentrationsverhältnis von  $H_2O_2$  zu Antioxidans gelegen haben. Von einigen Fällen ist bekannt, daß eine Erhöhung der Menge an Antioxidantien mit dem Grad der Resistenz korreliert (Alscher et al. 1987; May & Leaver 1993). Aufgrund der Lokalisation der beiden Radikalfänger in den Zellen muß vermutet werden, daß sie unterschiedliche ROS-Quellen abfangen. Ascorbinsäure ist im hydrophilen plasmatischen Raum der Zelle lokalisiert. Sie wird im Cytosol synthetisiert und von dort entlang eines Konzentrationsgradienten in die Chloroplasten, Vakuolen und den Apoplasten transportiert. Wirkt sie als Antioxidans, wird sie im Apoplasten zu Dehydroascorbinsäure oxidiert, diese wird mit hoher Rate ins Cytosol zurücktransportiert und dort wieder zu Ascorbinsäure regeneriert (Rautenkranz 1994). Die Wirkung von **Vitamin E** hingegen ist im wesentlichen auf lipophile Membranbereiche und Mitochondrien beschränkt, die ein bevorzugtes Ziel für den Angriff durch freie Radikale darstellen (Hess, 1993). Seine Biosynthese findet innerhalb der Chloroplastenmembranen statt, die Regenerierung von oxidiertem Vitamin E wird an der Cytosolmembran durch Wechselwirkung mit Vitamin C oder Glutathion vollzogen (Krieg 1992; Wefers & Sies 1988). Vitamin E ist ein effektiver Radikalfänger sowohl für Singulett-Sauerstoff als auch für organische Superoxidradikale (Battle et al. 1976). Es kann mit der Phytlykette in eine Membran eingebaut werden, so daß es mit der Phospholipid-Doppelmembran verbunden ist. Damit erfüllt es in der pflanzlichen Zelle die Funktion eines Regulators der Membranpermeabilität und trägt zur physikalischen Stabilisierung von Biomembranen bei (Guttridge 1978; Gorbunov et al. 1988; Urano et al. 1988). Resistenz gegenüber oxidativem Streß korreliert sehr mit erhöhten Konzentrationen an Antioxidantien bei einigen höheren Pflanzen. Deswegen wird in der Forschung die Meinung vertreten, daß eine Behandlung von Pflanzen mit Vitamin E deren Streßtoleranz erhöhen kann, jedoch konnte keine dieser Studien eine Änderung des Vitamin E-Gehalts in Blättern oder Früchten nachweisen, die von äußerer Applikation dieser Substanz herrührte (zur Übersicht siehe Oertli 1986). Trotzdem ist die Wirkungsweise von Vitamin E bekannt. Wenn die Produktion von freien Radikalen so stark wird, daß das antioxidative Schutzsystem nicht ausreicht, folgt

eine Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Fryer 1993). Membranen mit hohem Anteil an Resten solcher Fettsäuren sind sehr anfällig dafür. Was folgt, ist eine Erhöhung der Membranpermeabilität, ein Ionenausstrom und eine Zerstörung des pflanzlichen Gewebes (Scandalios 1993), was letztendlich zur Bildung von nekrotischen Läsionen führt. Die Radikalfängerwirkung von Vitamin E bzw. **Plantacur-E** konnte in mit *R. sachalinensis*-Extrakt induzierten Gurken bestätigt werden. Während die eigenen Experimente gezeigt haben, daß der oxidative Burst durch Scavenger wieder reduziert werden kann, gemessen an der befallenen Blattfläche und der produzierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge, wurde z. B. bei Straub (1995) Vitamin E nicht als Radikalfänger eingesetzt, sondern erfolgreich verwendet als Zusatzstoff zur Pflanzenstärkung, um damit indirekt den Fruchtschorfbefall bei Apfel zu bekämpfen. Schmitz & Noga (1996) behandelten Bohnen- und Apfelblätter mit Vitamin E, was eine höhere Resistenz des pflanzlichen Gewebes gegen Paraquat-induzierten oxidativen Streß ergab. Ähnliche Effekte wurden auch von Kunert (1984) beschrieben. Im untersuchten System Gurke / Echter Gurkenmehltau konnte auch **Staurosporin** die induzierende Wirkung des Extrakts partiell aufheben. Zum einen war das zu erkennen an der Befallserhöhung um 17,5 % (Infiltration), zum andern ging diese Wirkung einher mit einer Minderung der im Gewebe zu messenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge um ca. 66 %. Staurosporin ist ein Proteinkinase-Inhibitor, speziell ein Serin-Threonin-Kinase-Hemmstoff, der die Phosphorylierung von Proteinen unterbindet. Dadurch ist die Aktivierung der plasmamembrangebundenen NADPH-Oxidase unterbrochen, die im aktivierten Zustand Elektronen von NADPH auf der Innenseite der Membran zu molekularem Sauerstoff auf der Außenseite transportiert, wodurch dort  $\text{O}_2^-$  gebildet wird (Baker et al. 1995). Die ausschließliche Beteiligung der Proteinphosphorylierung bei der Regulation der NADPH-Oxidase wird von einigen Autoren in Frage gestellt. Im System Sojabohne konnte eine extrazelluläre Produktion von  $\text{O}_2^-$  im Rahmen des oxidativen Bursts nicht nachgewiesen werden (Levine et al. 1994). Behandlungen von Plasmamembranen mit Staurosporin zeigten in Bohnen keine Veränderung in der NADPH-abhängigen  $\text{O}_2^-$ -Bildung (Van Gestelen et al. 1998) und in Elicitor-induzierten Rosenzellkulturen (Murphy & Auh 1996). Felix et al. (1991,1993) konnten ebenfalls beobachten, daß mit Zugabe von Staurosporin die Proteinphosphorylierung, die Ethylenproduktion und die PAL-Aktivität in elicierten Tomatenzellen geblockt werden konnte. Schmidt et al. (1995) konnten mit K-252a, einem auf gleiche Weise wie Staurosporin wirkenden Proteinkinase-Hemmstoff, beweisen, daß dieser die Aktivität des Anionenkanals in *Vicia faba* schnell aufhob. Gleiches wurde auch durch Entfernung von ATP aus dem Cytosol erreicht. Nach Beno-Moualem & Prusky (2000) war es möglich, den oxidativen Burst von mit *Colletotrichum gloeosporioides* vorinokulierten Avocadozellkulturen durch die Zugabe von K-252a (1  $\mu\text{M}$ ) und Staurosporin (10  $\mu\text{M}$ ) um 70-94 % zu reduzieren. Otte & Barz (1996) haben in Zellkulturen von Kichererbsen nachweisen können, daß der Elicitor Hefeglucan seine induzierende Wirkung bei Vorbehandlung der Zellen mit Staurosporin (1,35  $\mu\text{M}$ ) verliert. Den gleichen Sachverhalt fanden auch Tamaoki et al. (1986) und Rüegg & Burgess (1989) vor. Oligogalakturonide bildeten vermehrt  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Gurken (Svalheim & Robertsen 1993), in Sojabohnen (Apostol et al. 1989; Legendre et al. 1993; Chandra & Low



1995) und in Rizinussamen (Bruce & West 1989), wobei dieser Burst durch den Einsatz von K-252a und Staurosporin wieder gehemmt werden konnte.

#### 4.3 Bedeutung von Inhibitoren der Xanthinoxidase und NADPH-Oxidase

Eigene Untersuchungen zur Beteiligung einer NADPH-Oxidase an der induzierenden Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts wurden mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor **DPI** durchgeführt. Die partielle Aufhebung der Befallsreduktion durch den biologischen Induktor in Gurken konnte auch von anderen Autoren in anderen Systemen beobachtet werden. Für Elicitor-behandelte Zellkulturen von Sojabohne und Petersilie und in *Arabidopsis* wurde der erfolgreiche Einsatz von DPI beschrieben. DPI scheint jedoch konzentrationsabhängig verschiedene Enzymwege der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung einzuschränken. Eine effektive Dosis von  $\leq 15 \mu\text{M}$  ist kennzeichnend für einen Eingriff in das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildende NADPH-System, wohingegen die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Peroxidaseaktivität z. B. in Bohnen erst durch Konzentrationen im Bereich von 100-250  $\mu\text{M}$  beeinträchtigt wird (Murphy, Bolwell, Davies & Gerrish, als unveröffentlicht zitiert nach Bolwell & Wojtaszek 1997). Andere Autoren berichteten über die z. T. entgegengesetzte Wirkung von DPI (Bestwick et al. 1997, 1998; Frahy & Schopfer 1998). Baker et al. (1998) zeigten, daß DPI die Oxidation von NADH und den Verbrauch von  $\text{O}_2^-$  durch Peroxidase in Abwesenheit von exogenem  $\text{H}_2\text{O}_2$  vollständig blockiert. Bei Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  stimulierte DPI dagegen die Oxidation von NADH durch Peroxidase, bis alles verfügbare  $\text{H}_2\text{O}_2$  verbraucht war. Die bei *R. sachalinensis*-Extrakt wirksamen Konzentrationen ließen auf eine Beteiligung des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildenden NADPH-Systems schließen. In den eigenen Untersuchungen konnte durch Infiltration von DPI in induzierte Gurkenblattscheiben bzw. Injektion in induzierte Kotyledonen eine Befallserhöhung erreicht werden, was darauf zurückgeführt werden kann, daß DPI hier seinen Wirkort zur Zeit der Induktion des oxidativen Bursts schon erreicht hatte. Wegen der großen Anzahl möglicher Reaktionen, in die DPI eingreifen kann, ist es schwer, seine Wirkungsweise zu verallgemeinern. Autoren haben in ihren Testsystemen die unterschiedlichsten Ergebnisse mit DPI erzielt. Kiba et al. (1997) konnten beobachten, daß die  $\text{O}_2^-$  Bildung in Elicitor-behandelten Erbsen von der zellwandgebundenen Peroxidase-Aktivität abhängig ist und nicht vom NADPH-Oxidase-System. Hier war DPI ohne jegliche Wirkung, während ein Peroxidase-Inhibitor (SHAM) die Bildung von Superoxidanionen einschränken konnte. Bolwell & Wojtaszek (1997) stellten weitere Funktionen von DPI fest. Es kann noch andere Proteine blockieren, wie z. B. die Xanthinoxidase, die NADPH-abhängige Cytochrom- $\text{P}_{450}$ -Reduktase und die Stickoxidsynthase. Erstgenanntes Enzym spielt eine Rolle bei den eigenen Experimenten zum Einsatz von Allopurinol, letzteres gewinnt zunehmend an Bedeutung, seit die Beteiligung von NO-Synthase an der Pathogenabwehr in vielen Wirt-Pathogen-Systemen beschrieben wurde (Cueto et al. 1996; Noritake et al. 1996). DPI kann auch ein direkter Gegenspieler von Cantharidin sein. Pachten & Barz (1999) konnten beobachten, daß DPI die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Akkumulation in Protoplasten-suspension von *Cicer arietinum* L., welche durch Cantharidin (17  $\mu\text{mol/l}$ ) induziert worden war, vermindern konnte. Gleichen Sachverhalt beschrieben auch andere Autoren für einige

andere Testsysteme (Auh & Murphy 1995; Jabs et al. 1997). Histologische Untersuchungen zur Wirkung von DPI auf pflanzliches Gewebe wurden von Grant et al. (2000) durchgeführt. Dabei konnten sie zeigen, daß DPI und Katalase partiell den Zellkollaps einer Hypersensitiven Reaktion abschwächen können. Experimente mit einem zweiten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildungshemmer (**Allopurinol**) sollten klären, ob der oxidative Burst eventuell eine weitere Quelle in Hinblick auf die Bildung von ROS besitzt bzw. ob zusätzlich andere Reaktionswege nach Induktion der Pflanzen aktiviert worden sind. Allopurinol ist bekannt als ein Inhibitor der Xanthinoxidase. Durch Bindung an den Enzymkomplex kommt es zur Hemmung der Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und der weiteren Oxidation zu Harnsäure, die mit einer Uricase zu Allantoin abgebaut würde. Sowohl Xanthinoxidase als auch Uricase sind  $\text{H}_2\text{O}_2$ -bildende Enzyme, wobei Xanthinoxidase dafür zuvor molekularen Sauerstoff zu  $\text{O}_2^-$  reduziert. Dieser bekannte Abbau von Purinen spielt in vielen höheren Pflanzen eine Rolle, insbesondere in Leguminosen, die mit  $\text{N}_2$ -fixierenden Bakterien Symbiose betreiben (Schubert & Boland 1990). Insgesamt zeigte das Unterbleiben jeglicher Reaktion der *R. sachalinensis*-behandelten Gurken auf Allopurinol, daß entweder in Gurken die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung nicht über die Reaktionskette Hypoxanthin-Xanthin-Harnsäure-Allantoin abläuft, oder die zu hemmende Xanthinoxidase in diesem Wirt nicht aktiv ist. Montalbini et al. (1995) berichteten darüber, daß die Allopurinol-Hemmwirkung eventuell nur nach dessen Oxidation zu Oxipurinol vorliegt. Eine derartige Oxidation wäre dann im System Gurke vielleicht nicht abgelaufen. Bei *Phaseolus*-Bohnen wurde gefunden, daß Allopurinol (400  $\mu\text{M}$ ) zu einer Hemmung der Xanthinoxidase *in vitro* von 91 % führte. Es verhinderte die Bildung von hypersensitiv-induzierten, makroskopisch erkennbaren nekrotischen Lokalläsionen und den damit verbundenen Elektrolytverlust, ein Maßstab für die Änderung der Permeabilität der Plasmamembran. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß eine frühe Aktivierung der Superoxid-produzierenden Xanthinoxidase in Bohnenblättern, die durch die inkompatible Wechselwirkung zwischen *Phaseolus vulgaris* und *Uromyces phaseoli* induziert wird, zu einer Superoxidanionbildung führen könnte. Die wiederum ist hauptsächlich für die Veränderung verantwortlich, die zu einer Erhöhung der Durchlässigkeit der Wirtsmembran führt und mit dem hypersensitiven Absterben der Zellen assoziiert ist. Da nach Induktion von Gurkenpflanzen mit *R. sachalinensis*-Extrakt keine Hypersensitiven Reaktionen vorlagen und eventuell nur mikroskopisch sichtbare HR zur Ausprägung kam, konnte dieser Effekt von Allopurinol für das eigenen Testsystem nicht reproduziert werden. Damit ist auch bewiesen, daß der oxidative Burst, wenn induziert durch den Extrakt, nicht den Weg über die Xanthinoxidase geht, wenngleich bekannt ist, daß  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Folge von Sauerstoff-Oxidoreduktaseaktivität der Xanthinoxidase bzw. Uricase produziert werden können (McCord & Fridovich 1968; Tolbert 1982). Montalbini (1993) konnte dieses Phänomen in umgekehrter Sichtweise auch bestätigen. Hier konnte Allopurinol in mit TMV infiziertem Tabak die Entwicklung von nekrotischen Läsionen nicht unterdrücken, so daß behauptet werden konnte, daß die Xanthinoxidase nur eine untergeordnete Rolle bei dem primären, hypersensitiven Zelltod in TMV-infizierten Tabakpflanzen spielt. Ádám et al. (2000) hingegen haben zeigen können, daß sich im System *Triticum aestivum* / *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* die Hypersensitive Reaktion nach Allopurinol-Behandlung nicht verändert, wohl aber war

eine leichte Abnahme der Anzahl nekrotischer Flecken zu verzeichnen. Gleichzeitig wurde auch registriert, daß eine Applikation von Allopurinol vor bzw. nach der Inokulation die Reaktion der Wirtspflanze auf den Erreger von anfällig zu hypersensitiv wechseln ließ. Verallgemeinert kann man festhalten, daß die Xanthinoxidase nicht generell bei der Ausbildung einer Hypersensitiven Reaktion durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies involviert ist (Ádám et al. 1992). Die Begründung des Nicht-Wirkens von Allopurinol in den eigenen Untersuchungen kann nicht damit begründet werden, daß der Wirkstoff den Wirkort seines Reaktionspartners nicht erreicht hat, da Sandalio et al. (1988) bereits in früheren Experimenten gefunden hatten, daß die Xanthinoxidase in der Matrix von Glyoxysomen vorliegt, wo auch schon SOD-Aktivität nach entsprechenden Aufreinigungsschritten nachweisbar war.

#### 4.4 Bedeutung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produzenten

Mit dem Einsatz von **Rhodamin B** sollte die Frage geklärt werden, ob Photosensitizer die Fähigkeit besitzen, ROS zu bilden, deren Wirkung den durch Induktion hervorgerufenen Effekten gleichkommt. In der Regel liefert die Tageslichtmenge, die für das Wachstum von Pflanzen notwendig ist, mehr Energie innerhalb des effektiven Spektralbereiches als für die Aktivierung von Photosensitizer benötigt wird (Graham 1972; Lavalie 1983). Angeregte Photosensitizer interagieren mit einem Substrat und molekularem Sauerstoff, wobei es zur Oxidation des Substrates und zur Bildung von aktiven Sauerstoffspezies kommt (Spikes & Glad 1964). Ganz allgemein kann unterstellt werden, daß fast alle Zellen lichtempfindlich gemacht werden können für photodynamische Zerstörung. Bekannt ist z. B., daß photodynamische Aktivität eine Anzahl von Enzymen, wie z. B. Peroxidase und Catalase, inaktivieren kann. Schwierig aber ist, es die Wirkung eines Photosensitizers für den praktischen Einsatz zu beschreiben, da mittlerweile durch zahlreiche Untersuchungen bekannt ist, daß ein und derselbe Farbstoff in unterschiedlichen Systemen positiv oder negativ agieren kann, wie z. B. Rhodamin selbst, welches nicht auf Trypsin reagiert. Das der Rhodamingruppe verwandte Phthalein aber zeigt eine positive Reaktion. Rhodamin B wurde in den eigenen Untersuchungen als geeigneter Photosensitizer ausgewählt, da es sich im Cytoplasma pflanzlicher Zellen anreichern kann und in Mitochondrien besonders gut gespeichert wird. Natürlich vorkommende Photosensitizer sind zwar rar, aber haben im Vergleich zu synthetischen Stoffen einen ebenso hohen Wirkungsgrad und in den meisten Fällen gleiche Wirkungsweise. Ein Beispiel für einen biologischen Photosensitizer ist das Cercosporinmolekül von *Cercospora* sp., welches photodynamisch aktiv ist, indem es durch Absorption von Lichtenergie in einen angeregten Zustand überführt wird. Diese Anregungsenergie kann spontan auf Sauerstoff übertragen werden, welcher in einen angeregten Singulettzustand übergeht. Der wichtigste Photosensitizer im Pflanzenbereich jedoch ist das Chlorophyll. Pflanzen werden gegen die toxischen Effekte ihres eigenen Chlorophylls durch Carotinoide geschützt (Foote 1968). Die Anregungsenergie wird dabei schnell auf die Carotinoide transferiert, da sie sonst oxidative Reaktionen in anderen wichtigen biologischen Molekülen, z. B. Enzymen, verursachen würde. Nach Bolwell et al.

(1995) ist bekannt, daß die Protein-Phosphorylierung an der Ausbildung der Induzierten Resistenz beteiligt ist, da der oxidative Burst durch Inhibitoren der Protein-Phosphatasen stimuliert werden kann. Diese Enzyme spalten den Phosphatrest ab. Dadurch bedingt stehen weniger phosphorylierte Proteine zur Verfügung, die die NADPH-Oxidase aktivieren könnten. Auch **Cantharidin** gehört zur Gruppe der Proteinphosphatase-Inhibitoren und gilt damit als Stimulans des oxidativen Bursts. Der erfolgreiche Einsatz von Cantharidin in den eigenen Experimenten in Form einer Wirkungsverstärkung der induzierenden Effekte des *R. sachalinensis*-Extrakts zeigt, daß höchstwahrscheinlich durch die forcierte Protein-Phosphorylierung die Aktivität der NADPH-Oxidase aufrechterhalten wird, die verantwortlich ist für die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu  $O_2^-$ . Eine Cantharidin-Behandlung könnte somit zu einem größeren  $O_2^-$ -Pool und einem daraus hervorgehenden größeren  $H_2O_2$ -Pool geführt haben, der in Kombination mit dem Induktor eine verbesserte Befallsreduktion zur Folge hatte. Die Wirkung von Cantharidin *per se* ist in anderen Systemen ebenfalls bekannt. Nach Otte & Barz (1996) beschleunigt und dehnt Cantharidin den durch einen Elicitor hervorgerufenen oxidativen Burst in Zellkulturen der Kichererbse nicht nur aus, sondern stimuliert die Antwort sogar in Abwesenheit des Elicitors. Ebenso ist in diesem System auch eine konzentrationsabhängige Wirkung beschrieben, die einhergeht mit einer zeitlichen Verschiebung im Auftreten des Bursts. Dabei induzieren höhere Dosen von Cantharidin eine frühere  $H_2O_2$ -Bildung. Hinsichtlich der beiden möglichen Wirkungsrichtungen von Cantharidin und Staurosporin ist es wichtig, daß ihr direktes Zusammenspiel übereinstimmend verläuft. Beide Substanzen stehen in unmittelbarer Konkurrenz zueinander bzw. sie interagieren miteinander bei dem Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Ein ausgeglichener Signaltransduktionsschritt scheint notwendig zu sein für die Induktion des sehr kurzlebigen oxidativen Bursts. Die Wirkung von Cantharidin *per se* wurde auch von Van Gestelen et al. (1998) in Übereinstimmung mit Low & Merida (1996) in Bohne beschrieben. Sie gehen davon aus, daß Cantharidin eine Rolle spielt für die Dephosphorylierung bei der Herunterregulierung des aktivierten oxidativen Burst-Mechanismus. Generell ist auch festzuhalten, daß geometrische Isomere (Derivate) von Cantharidin z. B. Endo-2,3-Dimethylanhydrid toxische Schäden bei Pflanzen hervorrufen, da sie eine erhöhte herbizide Aktivität haben.

#### 4.5 Beteiligung von NO an der Induzierten Resistenz

In der Pflanzenpathologie hat das **Stickoxid** in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Wie schon einleitend ausführlicher erläutert, wurde man im Rahmen von Untersuchungen zur Induzierten Resistenz auf dieses neue endogene, freie Radikal aufmerksam. Wie die eigenen Experimente gezeigt haben, spielen generell Sauerstoffradikale bei der Ausbildung einer Resistenz eine entscheidende Rolle. Deswegen könnten Wechselwirkungen zwischen diesen reaktiven O-Spezies (ROI) und reaktiven Stickstoffformen (RNI) eine regulatorische Bedeutung haben. ROI und RNI werden enzymatisch durch das plasmamembrangebundene NADPH-Oxidase-System, durch intrazelluläre Redoxsysteme oder durch NOS gebildet. Nach Timoshenko et al. (1999) wird die Fähigkeit zur Auslösung der  $H_2O_2$ -Produktion durch

NO gesteuert. Nach Glazener et al. (1996) konnten mutierte HR-negative Bakterien nur einen normalen oxidativen Burst verursachen, der für die Auslösung einer HR nicht ausreichte. NO konnte diesen Burst in der Pflanze potenzieren (Durner et al. 1998). Oxidative Bursts führten also nicht zwangsläufig zum Zelltod, erst ein höherer Spiegel von  $H_2O_2$  konnte die Pflanzen bzw. Zellkulturen zerstören (Richberg et al. 1998). Andererseits führte eine Hemmung der NO-Produktion bei Sojabohnen und Tabak zu einer Verhinderung der HR und damit zu einer Abschwächung der Resistenz. Durner et al. (1999) konnten zeigen, daß NO auch positive Nebeneffekte induziert wie Blattvergrößerungen, verstärktes Wurzelwachstum und Produktion von Phytoalexinen. NO reagiert so synergistisch mit Salicylsäure und ROS und verstärkt die Verteidigung gegen Pathogene. Dabei sind NO und ROS offenbar zuständig für das Redox-Signal, welches dann von Salicylsäure verstärkt wird. NO reguliert mit ROS zusammen den programmierten Zelltod und die Synthese von Peroxynitrit, eine sehr stark toxische (oxidative) Substanz, die das Pathogen direkt abtöten kann (Murphy et al. 1998). Salicylsäure kann auch gegen diesen NO-Signalweg agieren (Klessig et al. 2000), als potentieller Scavenger von NO und seiner Derivate. Delledonne et al. (1998) konnten den oben beschriebenen synergistischen Effekt durch externe Zugaben eines NO-Donators nachbilden und 5-10fache Erhöhung der Zahl ROI-induzierter Zelltod-programmierte Zellen feststellen. Wurde ein Elicitor eingesetzt, der den oxidativen Burst stimulierte, aber keinen Zelltod induzierte, ließ sich dieser auch durch zusätzliche exogene Gaben von NO hervorrufen. Die eigenen Untersuchungsergebnisse haben gezeigt, daß nach Behandlung von Gurkenpflanzen mit Extrakt eine HR ausblieb. Demnach lagen keine synergistischen Effekte vor, vielleicht nur eine cytoprotektive Wirkung, oder NO fungierte als Regulator bei der Bildung von  $H_2O_2$ . Bion induzierte ebenfalls einen, wenn auch geringeren oxidativen Burst nach 6 h. Hier traten ab einer gewissen Anwendungskonzentration Blattschädigungen auf. Dabei könnte der synergistische Effekt von NO und ROS die cytotoxischen Folgen hervorrufen. Da Infektionen von Gurken mit *S. fuliginea* ebenfalls eine erhöhte NO-Bildung zur Folge hatten, könnte in diesem Fall NO vielleicht als Zellschutzsubstanz die Pathogenabwehr einleiten. Besonders mit Physcion, aber auch mit *R. sachalinensis*-Extrakt, zeigten inokulierte Pflanzen eine stärkere und früher einsetzende NO-Entwicklung. Hier wirkten möglicherweise Induktor und Pathogen additiv oder synergistisch. In Beantwortung der Frage nach der Funktion von NO im System Gurke / Echter Gurkenmehltau ist geklärt, daß NO keinen schnellen Zelltod (erster Tag) auslöste, da dieser weder quantitativ erfaßbar war, noch Stickoxide erhöht vorlagen. Wegen der nahezu zeitgleichen Erhöhung von  $H_2O_2$  und NO könnte NO die Auslösung eines oxidativen Bursts steuern. Weniger wahrscheinlich ist, daß NO die Bildung von  $H_2O_2$  für den lokalen Zelltod potenziert. Der Grund hierfür könnte sein, daß NO und  $H_2O_2$  nicht in den selben Pflanzenzellen gebildet wurden. Da NO auch die Produktion von Phytoalexinen anregt, ließ sich damit ggf. die von Daayf et al. (1997) beschriebene Phytoalexinproduktion in Gurkenblättern nach Induktion mit *R. sachalinensis*-Extrakt mit und ohne Mehltaubefall erklären.

#### 4.6 Enzymaktivitäten

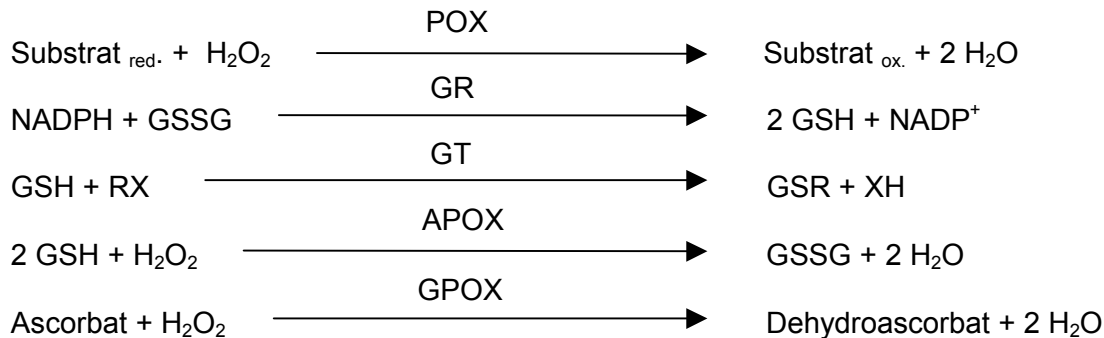
Aufgrund der besonders herausgestellten Bedeutung von ROS an der induzierenden Wirkung von *R. sachalinensis*-Extrakt und chemischen Induktoren konnten Aktivitätsänderungen von Enzymen erwartet werden, die unmittelbar mit dem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Metabolismus in Verbindung standen bzw. an diesen direkt vor- oder nachgeschaltet anknüpften. Generell sollte in Hinblick auf die Interpretation der Ergebnisse darauf geachtet werden, daß Enzymaktivitäten durch mannigfaltige Faktoren zusätzlich beeinflußt werden können. Es ist z. B. bekannt, daß **Peroxidase** erhöht in Pflanzen nach Verwundung oder bei fortgeschrittenem Pflanzenalter auftritt. Peroxidasen sind eine Enzymgruppe, die auf derartige Streßerscheinungen besonders reagiert (Kerby & Somerville 1989; Scott-Craig et al. 1995). Smith & Hammerschmidt (1988) konnten nach Pathogenbefall in vielen Vertretern der *Cucurbitaceen* gesteigerte POX-Aktivitäten nachweisen. Die verschiedenen Peroxidaseklassen, die eventuell hier eine Rolle spielten, unterscheiden sich aufgrund ihrer Substratspezifität. Zum einen könnten Guajacol-abhängige Peroxidasen beteiligt gewesen sein. Diese stehen in Zusammenhang mit Lignifizierungsprozessen durch NADH- oder NADPH-abhängige Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Elstner & Heupel 1976). Zum anderen stehen eventuell Ascorbat-Peroxidasen bereit, die die Entgiftung des im Chloroplasten entstehenden Wasserstoffperoxids übernehmen (Asada & Takahashi 1987). Da das Reduktionsmittel Ascorbat dafür im Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Foyer et al. 1994) regeneriert werden muß, in dem GR eine wichtige Funktion hat, ist die Beteiligung dieser Art von POX zu vermuten. Die dritte POX-Klasse, die Glutathion-POX, hat in pflanzlichem Gewebe keine große Bedeutung. Seneszenzbedingte Aktivitätsveränderungen konnten bei den eigenen Arbeiten an Gurke ausgeschlossen werden, da in zeitabhängigen Untersuchungen kein Anstieg der Peroxidase bei der unbehandelten Kontrolle zu verzeichnen war. Eine eindeutige Erhöhung aufgrund eines Pathogenbefalls jedoch war zu beobachten. Nach alleiniger Resistenzinduktion von Gurken mit *Reynoutria*-Extrakt konnte ebenfalls ein sofort einsetzender Anstieg gemessen werden. Irving und Kuć (1990) hatten im System Gurke mit dem Induktor Kaliumphosphat eine erhöhte systemische POX-Aktivität induzieren können. Goodman et al. (1986) fanden, daß bei Pflanzen mit HR, hervorgerufen durch eine Virusinfektion, der Anstieg der POX-Aktivität eine der auffälligsten Reaktionen war. Die Tatsache, daß POX bei der Abwehr von Infektionen eine Rolle spielt, zeigten schon Montalbini & Marte (1972) im System Bohne / Bohnenrost. Isoenzyme der Peroxidase traten dort bei Pflanzen auf, die mit einer HR reagierten. Bei Infektion zeigte sich eine anfängliche Abnahme der Aktivitäten, die nach Bestwick et al. (1998) eine unspezifische Änderung darstellt, welche in vielen Systemen auftritt und mit dem Pathogenbefall assoziiert werden kann. Die Abnahme beruht auf einer Hemmung der Enzymsynthese oder auf Verlagerung in eine Umgebung wie die Zellwand. **Catalase** ist in vielerlei Hinsicht eng verbunden mit den Reaktionen der Peroxidase. CAT kann ebenfalls  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutieren, in diesem Fall zu  $\text{O}_2$  (Butt 1980). Unter bestimmten Bedingungen kann jedes der beiden Enzyme die Reaktion des anderen katalysieren. Im Vergleich aber zu POX hat CAT eine wesentlich geringere Affinität zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mittler & Zilinskas 1991; Miyake & Asada 1992). Daher kann POX noch bei wesentlich geringeren

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen aktiv sein (Mizuno et al. 1998). Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß, sofern ein Zusammenhang mit verstärkter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung besteht, sein Abbau nur zeitlich verzögert stattfindet. CAT kann wegen ihres verspäteten Aktivitätsanstiegs nicht direkt am oxidativen Schutzsystem beteiligt sein. Foyer et al. (1994) und Feierabend et al. (1992) warnten aber davor, die Schutzwirkung dieses Enzyms überzubewerten, da es vorwiegend in Peroxisomen lokalisiert ist, eine relativ geringe Substrataffinität besitzt und durch Lichteinwirkung inaktiviert werden kann (Feierabend & Enger 1986; Feierabend et al. 1992; Streb et al. 1993). Genau wie bei Kalix (1996) konnte eine Hemmung der CAT-Aktivität in induzierten Pflanzengewebe verzeichnet werden, die sich erst 24 h nach Induktorbehandlung wieder auflöste. Eine abnehmende CAT-Aktivität stellt nach Strother (1988) ein typisches Merkmal für seneszenzierende Blätter dar. Kalix (1996) stimmte dem zu, da er nach Resistenzinduktion ein schnelleres Altern der behandelten Blätter verzeichnen konnte. Gurkenpflanzen hingegen zeigten nach Extrakt-Applikation kein derartiges Erscheinungsbild. Herger & Klingauf (1990) bestimmten dazu den Chlorophyllabbau bzw. die Vergilbung als Maß für die Seneszenz. Extraktbehandelte Gurken alterten um das 2,5fache langsamer als die unbehandelte Kontrolle. Die in Pflanzen vorhandenen **Superoxiddismutasen** werden entsprechend den im aktiven Zentrum vorkommenden Metallionen in drei Klassen eingeteilt: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und Fe-SOD (Bowler et al. 1994). Halliwell (1984) und Scandalios (1993) konnten einen Zusammenhang zwischen Vorhandensein von oxidativem Streß und erhöhter SOD-Aktivität beweisen. Leshem (1988) überprüfte die mögliche Rolle von SOD bei der Regulation der Seneszenz. Die Aktivierung von SOD während der Hypersensitiven Reaktion wurde als protektiver Schutzmechanismus der Pflanzen vor oxidativer Zerstörung durch freie O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Radikale diskutiert (Croft et al. 1990). Bei den eigenen Untersuchungen wurde erhöhte SOD-Aktivität in unmittelbarer zeitlicher Nähe des oxidativen Bursts festgestellt. Oft wird die Frage gestellt, ob ausreichend hohe SOD-Aktivität die Ausbildung einer HR partiell oder gänzlich unterbinden kann. Die von Doke (1983) durchgeführten Untersuchungen an Kartoffeln zeigten den Zusammenhang zwischen der Hemmung der SOD und einer verzögert einsetzenden HR. Es wurde eine enge Korrelation zwischen der Superoxidradikalbildung nach Induktion systemischer Resistenz gegenüber *Phytophthora infestans* und dem Anstieg der SOD-Aktivität nachgewiesen. Hier könnte ein Erklärungsansatz für eine makroskopisch symptomlose HR bei der Induktion von Gurken mit *Reynoutria*-Extrakt liegen. Die abgeschwächte und um vier Tage verzögerte Aktivität in Gurkenpflanzen nach Induktion mit *R. sachalinensis*-Extrakt kann durch die bekannte Keimverzögerung des Extrakts bedingt sein. Ein weiteres Enzymsystem, das bei Redoxreaktionen eine wesentliche Rolle spielt, ist das des Glutathionumsatzes. **Glutathionreduktase** befindet sich in vielen Pflanzengeweben. Dort ist sie entweder nicht an bestimmte Kompartimente gebunden oder bevorzugt in den Chloroplasten (Foyer & Halliwell 1976; Hossain et al. 1984; Gillham & Dodge 1986), von denen sie durch Aufreinigungsschritte wie Homogenisieren und Zentrifugation isoliert werden kann (Halliwell 1974 a). Eine Reihe von Formen wurden schon nachgewiesen (Edwards et al. 1990; Madamanchi et al. 1992). Anderson et al. (1952) zeigten, daß Cucurbitaceen im Vergleich zu Gramineen 3,5fache GR-Aktivität aufwiesen. Die Frage der Funktion der GR beim H-

Transfer in der Pflanze wurde ausführlich bei Mapson & Goddard (1951) diskutiert und von Meckel (2000) wieder aufgegriffen. GR gehört zu den Enzymen, die nicht wie SOD und CAT direkt mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren und so deren Konzentrationen niedrig halten, sondern regeneriert Antioxidantien. Zu dieser Gruppe gehören außerdem Dehydroascorbatreduktase sowie die Substrate Glutathion und NADPH (Smirnoff 1993). GR reduziert oxidierte (= verbrauchte) Antioxidantien, wofür es Elektronen von anderen Antioxidantien oder von üblichen Reduktionsintermediaten bezieht, so reduziert sie Glutathion (GSSG) mit NADPH zu GSH, so daß in den Zellen die GSH-Konzentration insbesondere unter Streßbedingungen konstant bleibt. GSSG entsteht dadurch, daß GSH Peroxide reduziert und freie Radikale abfängt. GR-Aktivität benötigt also NADPH; dementsprechend ist sie in den Mesophyllzellen zu finden (Burgener et al. 1998). Die eigenen Untersuchungen bestätigten die Funktion von GR, den Antioxidantienhaushalt im Gleichgewicht zu halten. Lagen vermehrt Antioxidantien bereit, sank die GR-Aktivität. Kompensierten sich Radikalfängerwirkung und ROS-Gehalt in der Pflanze bzw. war der ROS-Gehalt so hoch, daß phytotoxische Schäden zu befürchten waren, folgte eine Steigerung der GR-Aktivität. Ein direkter Bezug zu dem Extrakt-induzierten oxidativen Burst, der eine erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion 6 h nach Extraktbehandlung darstellte, drückte sich in der Erhöhung der GR-Aktivität zum gleichen Zeitpunkt aus. Die Aufgabe der **Glutathion-S-transferase** ist vor allem die Entgiftung der Pflanze auch von extern zugeführten Toxinen, z. B. Herbiziden (Sandermann 1992; Coleman et al. 1997). Frear & Swanson (1970) veröffentlichten erstmals über das Vorkommen von GT in Pflanzen, insbesondere beschrieben sie eine Atrazin-spezifische GT in Getreidepflanzen. Allerdings synthetisiert auch die Pflanze verschiedene toxische Sekundärmetabolite, die alle potentielle GT-Substrate sein können (Müller et al. 2000), was die Erforschung der GT erschwert. Die GT-Reaktion verbraucht reduziertes Glutathion (GSH) und bildet unterschiedliche oxidierte Derivate (GSR, R = Rest). Nach Armstrong (1991) katalysiert GT die Beseitigung des Thiol-Protons von GSH. Entstehende Konjugate (GSR) können sowohl von Guaiacol-Peroxidase (POX) als auch von Ascorbatperoxidase (APOX) weiterverarbeitet werden. Erstere wirkt mit bei der Biosynthese von Lignin und Ethylen, letztere dient der Beseitigung von überschüssigem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Asada 1992). Alle pflanzlichen GT befinden sich im Cytoplasma, im Apoplasten (Flury et al. 1996) oder im Zellkern (Takahashi et al. 1995). Einige GT-Formen haben zusätzlich Aktivität als Glutathionperoxidase (GPOX), aber dann keine Aktivität gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Eshdat et al. 1997). GT-Enzyme stehen in Zusammenhang mit der Bildung von ROS und reagieren auf oxidativen Streß. Demgegenüber steht die Aussage, daß  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Sojabohnen eine Akkumulation von mRNA induziert, die für GT codiert, welche vergleichbar ist mit der GT, die durch den Glucan-Elicitor von *P. megasperma* induziert wird (Levine et al. 1994; Tenhaken et al. 1995). Die eigenen Experimente haben ebenfalls eine erhöhte Aktivität der Glutathion-S-transferase zeigen können, was auf eine Beteiligung am Abbau des oxidativen Bursts schließen ließ. Die Tatsache, daß die GT-Aktivität dabei später anstieg als GR, wies darauf hin, daß GT die Reaktionsprodukte von GR weiterverarbeitete. Ein ähnliches Mitwirken konnten schon Edwards & Owen (1988) an Bohnenzellkulturen mit einem Elicitor (Zellwand von *Colletotrichum lindemuthianum*) zeigen. Diese Zellkulturen



wiesen eine 2-3fach erhöhte Aktivität 4-8 h nach Behandlung auf, d. h. GT spielte eine aktive Rolle im pflanzlichen Abwehrmechanismus. Zur Übersicht die beteiligten Reaktionen:



**Chalkonisomerase** übernimmt eine katalytischen Reaktion in der Flavonoid-Biosynthese (Moustafa & Wong 1967; Spribille & Forkmann 1981). Ihr vorgeschaltet in der Reaktionskette ist die Chalkonsynthase (CHS). Höhere Pflanzen verwenden Flavonoide als Farbstoffe, u. a. zum Schutz gegen UV-Schäden. Isoflavonoide agieren z. T. antimikrobiell (Phytoalexine). Die eigenen Untersuchungen der CHI-Aktivität zeigten eine sehr frühe Beteiligung des Enzyms bei der Induktion von Gurkenpflanzen mit Bion oder *Reynoutria*-Extrakt. Bei gleichzeitig vorhandenem Mehltaubefall konnte nur in Bion-behandelten Pflanzen gleichzeitig mit der Entwicklung des Pilzes verstärkt CHI nachgewiesen werden. Insgesamt aber waren die CHI-Aktivitäten sehr gering verglichen mit anderen in der Literatur beschriebenen Analysen. Aufgrund des zeitigen Einsatzes von CHI beim Induktionsprozeß könnte die Bedeutung von CHI für die Gurkenpflanzen in der Bildung antimikrobiell wirksamer Flavonoide liegen. Lawson et al. (1994) fanden 6 h nach Inokulation eine Aktivierung von Genen für die Chalkonsynthase. In verwundeten Kotyledonen von Bohnen konnte der Syntheseweg der CHS durch Phytoalexine gehemmt werden (Hinderer & Seitz 1985). Desweiteren könnte die Erhöhung der CHI-Aktivität nach Induktion der Pflanzen mit Bion oder Extrakt im Zusammenhang mit der Regulation des Auxin-Transportes stehen. Arioli et al. (1994) berichteten, daß Flavonoide den polaren Auxin-Transport regulieren. Als positiver Nebeneffekt von *R. sachalinensis* ist vermehrtes Haupttriebwachstum induzierter Begonienpflanzen bekannt, was eine Beteiligung von Phytohormonen bei der Induktion einschließt.

#### 4.7 Lokalisierte Nachweise von Angriff und Abwehr

Die histologischen Untersuchungen beschäftigten sich auch mit der Frage der direkten Wirkung der Induktoren auf das Pathogen. Die Keimhemmung von Konidien des Gerstenmehltaus auf mit *R. sachalinensis*-Extrakt behandelten Gerstenblättern deutete zuerst auf eine starke direkte Wirkung des Extrakts hin. Eine typische fungizide Wirkung besteht in einer Stoffwechselhemmung, die in einer Unterdrückung der Konidienkeimung mündet. Da aber auch die modifizierte *Reynoutria*-Variante eine geringe Keimrate verursachte, müssen hier eventuell andere Faktoren für die Keimhemmung verantwortlich gemacht werden. Schleinig (1991) untersuchte die Konidienkeimung des Echten

Gerstenmehltau und fand eine vier Tage andauernde Hemmung durch den Extrakt. Herger et al. (1988) beschrieben einen inhibierenden Effekt des Extrakts bei Gurkenmehltau auf Glasobjektträgern. Die direkte Wirkung wurde deswegen von beiden Autoren als fungistatisch deklariert. Im Normalfall keimen Konidien des Echten Mehltaus innerhalb von 24 h und verlieren danach ihre KF und Infektiosität. Bei Anwesenheit des *R. sachalinensis*-Extrakts kann es vielleicht bei fehlendem Pflanzenkontakt und damit einhergehend in einem anderen Mikroklima zu völlig anderen Reaktionen kommen. Ungeklärt ist außerdem, inwiefern von der Pflanze gebildete Stoffe keimhemmend wirken. Diffundierende Substanzen wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Produkte des sekundären Metabolismus können nach Induktorbehandlung verstärkt gebildet werden und Keimhemmung auslösen (Vallélian-Bindschedler 1998; Feucht et al. 1999). Zusätzlich kam es in der mit *R. sachalinensis*-Extrakt behandelten Variante zu einer **Degenerierung** der appressorialen Keimschläuche. Diese könnte ebenfalls von einer fungiziden Wirkung des Extrakts herrühren, da Zellmißbildungen mit morphologischen Veränderungen der Hyphen von pilzlichen Pathogenen als möglicher Effekt von Fungiziden, z. B. Benzimidazolen beschrieben wurde (Buchenauer 1983). Carver et al. (1995) zeigten, daß Cutinmonomere von der Konidie erkannt werden und die Bildung des primären Keimschlauches bewirken, der wiederum die Ausbildung, aber nicht die Differenzierung des zweiten, appressorialen Keimschlauchs auslöst. Saile (1999) fand nach Induktorbehandlung, u. a. mit Bion, eine Veränderung in der Kutikulazusammensetzung. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, daß nach Extrakt-Behandlung die Erkennungsreaktion der Blattoberfläche durch die Konidien verändert werden kann. Bei Betrachtung des Wirkungsgrades der Induktoren im System Gerste fällt auf, daß die induzierende Wirkung des Extrakts konzentrationsabhängig ist. Das von Schönbeck et al. (1993) postulierte Fehlen des Dosis-Wirkungsprinzips für Resistenzinduktoren traf hierbei nicht zu, im Fall Bion nur partiell. Der Induktor DCSA erwies sich als schwacher Induktor an Monocotyledonen, was auch schon von Görlach et al. (1996) beschrieben wurde. Die **effektive Papillenbildung** im **Koleoptilensystem** war verbunden mit einer deutlich zu erkennenen Cytoplasmaströmung in den Epidermiszellen der Gerste 24 h nach Inokulation. Nach Beckhove et al. (1996) tritt Cytoplasmaströmung bei resistenten oder induzierten Zellen stärker auf, setzt aber vor allem zu einem früheren Zeitpunkt ein, unabhängig vom Resistenztyp oder Resistenzmechanismus. Bereits der primäre Keimschlauch induzierte Cytoplasmaströmung, was dessen Wichtigkeit bei der Interaktion Wirt-Pathogen unterstreicht. Weiterhin war eine ausgeprägte Papillengenese bis 72 h nach Infektion hinsichtlich Färbung und Größe zu beobachten. Aist & Israel (1986) stellten die Arbeitshypothese auf, daß die Größe der Papille ihre Effektivität widerspiegelt. Die Bildung übergroßer Papillen setzte zeitlich früher ein und sie enthielten mehr und andere phenolische Inhaltsstoffe. Bei den Untersuchungen an **Primärblättern** mußten zunächst die unterschiedlichen Phänotypen der Epidermiszellen und die damit verbundenen unterschiedlichen Ausprägungen der Resistenzantwort berücksichtigt werden. Koga et al. (1980, 1990) fanden eine höhere Rate der Papillenbildung an langen als an kurzen Epidermiszellen und HR häufiger an kurzen epidermalen Zellen. Aus diesem Grund wurden nur kurze Epidermiszellen (Typ A und Typ B) in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Fluoreszenzmikroskopie gewährleistete, die HR zu detektieren sowie auch Papillen

besser zu erkennen. Bei der Analyse der  $H_2O_2$ -Akkumulation wurden keine quantitativen Unterscheidungen der Braunfärbung gemacht, da störende Faktoren nicht einzuschätzen waren. Die Bildung effektiver Papillen als Resistenzmechanismus spielte bei den einzelnen Induktoren eine unterschiedlich große Rolle. Der Durchmesser der Papillen nahm bis 48 h nach Inokulation je nach Testsystem zu, was nach Koga et al. (1980) von entscheidender Bedeutung ist, da die Papillengröße mit der Intensität der Resistenz höchstwahrscheinlich korreliert. Zudem fluoreszierten größere Papillen stärker als kleinere. Eine stärkere Autofluoreszenz bewirkt eine größere Penetrationsresistenz (Mayama & Shishiyama 1978; Koga et al. 1980; Aist & Israel 1986; Thordal-Christensen & Smedegard-Petersen 1988). Unterschiede in den Fluoreszenzcharakteristika von Papillen in verschiedenen Gerstensorten wiesen auf unterschiedliche chemische Zusammensetzung hin, die auch eine chemische Barriere bedeuten konnten. Stadnik & Buchenauer (2000) zogen den Schluß, daß autofluoreszierende Komponenten wahrscheinlich phenolischer Natur und an der quantitativen Resistenz in Weizen beteiligt sind. Ihre Untersuchungen an Weizen zeigten, daß eine Behandlung mit Bion eine intensivere Autofluoreszenz unter den Appressorien verursachte. Die **Hypersensitive Reaktion** kann zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Pilzentwicklung eintreten. Sie kann bei bzw. kurz nach einer erfolgreichen Penetration auftreten (Aist & Bushnell 1991), d. h. ihr kann eine Papillenbildung oder die Bildung einer Haustoriumsinitiale vorausgegangen sein. Ein solcher zeitlicher Unterschied wurde durch Kogel & Hükelhoven (1999) an verschiedenen isogenen Gerstenlinien festgestellt. In den eigenen Versuchen stellten sich Bion und DCSA als HR-auslösende Induktoren heraus. Der Zeitpunkt der HR bzw. ein der HR vorausgegangenes Ereignis war nicht zu detektieren, da in den HR-Zellen alle Strukturen kollabiert waren. Für die Ausprägung von Induzierter Resistenz wurde wiederholt auf eine Prädisposition zur HR als Voraussetzung der Aktivierung der pflanzeigenen Abwehr hingewiesen (Kessmann et al. 1996). Am Beispiel der Resistenzinduktion durch *Reynoutria*-Extrakt wurde deutlich, daß Abwehrmechanismen auch ohne die Erfüllung dieser Reaktion ausgelöst werden können. Hypersensitive Reaktion bzw. Nekrosenbildung scheinen für die Erregerunspezifität eine Bedeutung zu haben, wie es bei Bion, DCSA und DCINA beschrieben wurde (Saile 1999; Kogel et al. 1994). Desweiteren scheint eine HR mit der systemischen Ausbreitung der IR zu korrelieren (Kuć 1982; Chen et al. 1995). Diese systemische Wirkung lag bei *Reynoutria*-Extrakt auch nicht vor, wohl aber bei Bion, DCINA und DCSA. Das Phänomen, daß gekeimte Konidien kein Haustorium ausbildeten und keine Penetrationsversuche durchführten (**ohne sichtbare Zellantwort**) trat bei Bion-Behandlung auf. Nach Bushnell & Bergquist (1974) sollen Konidien in manchen Fällen eine Cytoplasma-Aggregation hervorgerufen haben, die sich wieder auflöste, ohne daß eine Papille gebildet wurde. Die Konidien bildeten anschließend auch kein Haustorium aus. Die Gründe für fehlende Zellantworten könnten an einer unspezifischen Reaktion der Pflanze auf das Pathogen liegen. Wasserstoffperoxid kann die Konidienkeimung hemmen (Peng & Kuć 1992), Flavanole wirken eventuell als Oxidantien (Feucht et al. 1999). Die Bildung von ROS spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr der Pflanzen. Dabei hat in Gerste  $H_2O_2$  die eigentlich tragende Funktion und nicht das Superoxidanion. Die eigenen Ergebnisse zeigten, daß  $H_2O_2$ -Bildung in Gerste räumlich und zeitlich mit der Ausprägung

von effektiven Papillen und HR korrelierte, während  $O_2^-$  in einem anderen Muster auftrat. Eine NADPH-Oxidase als gemeinsame Quelle von  $H_2O_2$  und  $O_2^-$  ist deshalb bei Monokotyledonen unwahrscheinlich. Im Zuge der HR kam es zu einer  $H_2O_2$ -Akkumulation im gesamten Zellumen, die 24 h nach Inokulation in den einzelnen HR-Zellen am intensivsten war. Die HR in der Gerstensorte "Pallas" ist nach Hückelhoven et al. (1999) streng korreliert mit verstärkter  $H_2O_2$ -Bildung. Baker & Orlandi (1995) hingegen gaben an, daß HR auch ohne vermehrtes  $H_2O_2$  entstehen kann, so daß  $H_2O_2$  nicht alleiniger Auslöser für eine HR ist. Im Zuge der HR wurde auch an und in den darunterliegenden Mesophyllzellen  $H_2O_2$ -Anreicherung beobachtet (Hückelhoven et al. 1999). Diese Bildung in der Zone zwischen Mesophyll und Epidermis soll der HR vorausgehen und diese einleiten (Thordal-Christensen et al. 1997). Dies könnte ein Grund dafür sei, warum es in Koleoptilen keine HR gibt. Über den Beobachtungszeitraum hinweg war eine deutliche  $H_2O_2$ -Akkumulation in den Leitbündeln zu verfolgen. Dies ist vor allem Ausdruck der Lignifizierung in diesen pflanzlichen Strukturen (Olson & Varner 1993). Orozco-Cardenas & Ryan (1999) hielten die DAB-Färbung von Blattadern für eine spezifische Reaktion auf Verwundung. In beiden Fällen wurde die  $H_2O_2$ -Bildung jedoch nicht in Zusammenhang mit Pathogenabwehr gebracht. Ein Grund für erfolgloses Eindringen eines Erregers in eine induzierte Pflanze kann z. B. eine Modifikation der im Bereich des Appressoriums liegenden Epidermiszellwand sein (Hammerschmidt 1999). Nicht alle Appressorien werden blockiert, manchmal werden primäre Keimhyphen gebildet, die aber in ein Lignin-ähnliches Polymer eingeschlossen sind, das vermutlich die weitere Entwicklung der Hyphe hemmt (Stein et al. 1993), oder die ganze Epidermiszelle wird lignifiziert (Kovats et al. 1991). Abgestorbene Zellen können durch Autofluoreszenz erkannt werden (Holliday et al. 1981), in ungefärbtem Gewebe grünlich-gelb. Das Cytoplasma hat sich dabei in der Regel partiell oder ganz von der Zellwand gelöst und ist kollabiert wie bei einer HR. Autofluoreszenz wurde auch in infizierten, makroskopisch aber symptomlosen Pflanzen beobachtet. Nekrosen erschienen nur, wenn die Wirtszelle in einem Zustand aktiver Proteinsynthese war. Schnell absterbende Wirtszellen sind vielleicht als Stimulus für das Anspringen eines aktiven Resistenzmechanismus, z. B. der Phytoalexinbildung in benachbarten Zellen anzusehen (Hargreaves & Bailey 1978). Die Identität der fluoreszierenden Substanzen ist in den meisten Fällen noch unbekannt, in Weinreben ist dafür Resveratrol verantwortlich (Langcake & McCarthy 1979), in Tabak Scopoletin (Copeman 1969). Da sich diese auch in induzierten, symptomlosen Pflanzen akkumulieren, wurde die Ausbildung von HR-Zellen definitiv als Bestandteil der Resistenz betrachtet. Akkumulation von  $H_2O_2$  nach Induktion wurde auch in Gurkenpflanzen beobachtet. Nach Vanacker et al. (2000) ist ein sehr frühes Stadium einer HR an der Bildung von  $H_2O_2$  in den Nachbarzellen der attackierten Zelle zu erkennen. Zuerst erscheinen braune Kreise an den Kontaktstellen zwischen der attackierten Epidermiszelle und den darunterliegenden Mesophyllzellen. In Gerste sind diese gefärbten Mesophyllbereiche schon 14 h nach Inokulation sichtbar, nicht aber Verfärbungen der befallenen Epidermiszelle. Mesophyllzellen mit verstärkter  $H_2O_2$ -Bildung zeigten keine Autofluoreszenz, sie leben und sind durch den oxidativen Streß, dem sie ausgesetzt sind, nicht verletzt. Zelltod ist danach keine direkte und unvermeidliche Konsequenz starker  $H_2O_2$ -Produktion. Wenn die  $H_2O_2$ -Farbreaktion in den

Epidermiszellen nach der Inokulation wieder verschwindet, kann entweder die Produktion von  $H_2O_2$  zurückgegangen sein oder die Kapazität des antioxidativen Systems wurde erhöht. Dieses Schutzsystem nahe bei der  $H_2O_2$ -Bildungsstelle könnte während der initialen Phase des oxidativen Bursts für kurze Zeit überbeansprucht sein (Lamb & Dixon 1997; Wojtaszek 1997). Vergleichende histologische Untersuchungen der induzierenden Wirkung von *R. sachalinensis*-Extrakt (Milsana) und Bion wurden von Wurms et al. (1999) mit Gurkenpflanzen begonnen. Dabei traten nach Milsana-Behandlung Cytoplasma-Aggregation, Kollaps von pathogen-attackierten Gewebezellen, Verlust von Zellorganellen und eine Zerstörung der Ultrastruktur von Haustorien ein. Außerdem verminderte Induktor-Behandlung die Größe der Amyloplasten durch Abbau der Stärkereserven. Bei dem nicht fungitoxischen Milsana (Daayf et al. 1995, 1997) spielte die Papillenbildung als mögliche Pathogenabwehr in Form einer Barriere keine Rolle (Wurms et al. 1999). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen mit Gurke nicht bestätigt werden. In den ersten 24 h nach Inokulation war die effektive Papillenbildung von entscheidender Bedeutung. Diese schwächte nur z. T. im Lauf der Pathogenese ab zugunsten der HR. Wegen eines schnellen und extensiven Zusammenbruchs des Pilzmycels von *S. fuliginea* nach mehrfacher Applikation wurde eine Beteiligung von Phenolen vermutet. Phenolakkumulationen waren lokal, was der nicht systemischen Wirkungsweise von *R. sachalinensis*-Extrakt entsprach. Die Anwesenheit dieser Stoffgruppe nach Induktion von Gurken mit dem Extrakt konnte bestätigt werden.

#### 4.8 Wirkungen auf die Konidienkeimung

Die Untersuchungen zur Beteiligung von sekundären Pflanzenstoffen an der induzierenden Wirkung des *R. sachalinensis*-Extrakts konzentrierten sich auf die Stoffgruppe der **Phenole**, insbesondere auf die **Catechine** und die von ihnen abgeleiteten Gerbstoffe. Nach Feucht et al. (2000) können die Wände von Pilzhyphen stark mit extern applizierten **oligomeren Proanthocyanidinen** (Flavonoide) und mit monomerem Catechin komplexieren. Niederleitner et al. (1994) beobachteten entsprechend, daß Konidien auf der Blattoberfläche mit exogen zugeführten Flavanolen unlösliche Verbindungen eingingen. Diese Flavanole konnten dann sowohl in die Konidien als auch in die Pilzhyphen eindringen und erstere bei der Keimung hemmen. Nach Charlton et al. (1998) wird zwischen Pilzproteinen und Catechin eine starke Bindung aufgebaut, weil der Pilz spezielle Komponenten mit günstigen Bindungseigenschaften für monomere Flavanole besitzt. Z. B. haben lange und prolinreiche Proteinsequenzen eine starke Bindungskapazität für Polyphenole. Die Substanz an sich zeigt keine Neigung, eine Verbindung einzugehen, im Gegenteil die Monomere müssen zu oligomeren Strukturen umgewandelt werden, um Affinitäten mit besonderen Proteintypen für die Präzipitationsreaktionen zu erlangen (Hagerman et al. 1998). Aus phytopathologischer Sicht ist die Beeinträchtigung der Semipermeabilität der Wirtszellenmembran entscheidend (Lai et al. 1968; Matern et al. 1995), denn dadurch können Phenole auch von innen an die Oberfläche von Zellen und in Gewebe gelangen (Zobel & March 1993; Cvikrova et al. 1988; Feucht et al. 1997). Unter solchen freiwerdenden Phenolen spielen die oligomeren Flavanole aufgrund ihrer Eigenschaft sich mit Proteinen zu verbinden (Haslam 1994) und Enzyme

(Penetrationsenzyme) zu hemmen (Goldstein & Swain 1965; Bell et al. 1965) wahrscheinlich eine bedeutende Rolle beim Schutz der Pflanzen gegen eindringende Pathogene. Ein weiterer Aspekt wurde von Elstner et al. (1994) und Aver'yanov & Lapikova (1994) angeführt: aktive Sauerstoffspezies, die das Gewebe schädigen, waren funktionell vergleichbar mit ortho-Chinonen, indem sie wie diese die Vitalität eindringender Pathogene minderten. Desweiteren sind Phenole während spontaner und POX-Oxidation in der Lage, AOS zu bilden, um dann gemeinsam Wirtszellen über den HR-Weg zu zerstören. Andererseits beschrieben Scott & Slater (1981), Torel et al. (1986), Huguet et al. (1990), Okuda (1993) und Foyer et al. (1994) Flavonoide und Catechin als Radikalfänger bzw. Antioxidantien. Dabei wurde vermutet, daß die Hemmung von oxidativen Prozessen durch diese Stoffgruppen zu einer sauerstofffreien Radikalfängerwirkung führt, der die Lipidperoxidation von Membranen verhindert. Catechin fungierte als Radikalfänger in enzymatischen und nicht-enzymatischen Systemen. Bei Anthocyanidinen wurde das deutlich, indem sie Collagenfibrillen gegen Degradierung durch Superoxidanionen schützten und die Collagenbiosynthese und Vernetzung von Collagenfibrillen aktivierten. Yamamoto et al. (2000) zeigten, daß Catechin (monomeres Flavanol) und dessen Oligomere (Proanthocyanidine) infektionshemmende Faktoren sind. Sie inhibierten die Bildung von Infektionshyphen des Appressoriums, nicht aber die Konidienkeimung und Appressorienbildung selbst. Folglich unterblieben Läsionen. Somit war die Akkumulation von Catechin ein Maß für die Induzierte Resistenz, jedoch wird dabei ein Resistenzmechanismus angesprochen, der sich von dem mit Phytoalexinbildung und HR unterscheidet. Die Gerbstoffe kommen häufig nur in spezialisierten Zellen (sog. Idioblasten), dort aber in sehr großen Mengen vor. Meist erscheinen sie in der Vakuole als große Tropfen, bisweilen auch als schmales Band entlang der Innenseite des Tonoplasten. Häufig treten auch sehr feine Kügelchen in der Vakuole auf, die dann offenbar zu größeren Gebilden zusammenfließen. Die Zellen im Abschlußgewebe der Rinde sind meist ganz mit Gerbstoffen ausgefüllt. Trotzdem leistet sich die Pflanze nicht den Aufwand, alle Zellen mit den unter erheblichem Energieaufwand zu synthetisierenden Gerbstoffen anzufüllen. Lediglich zwei Zellreihen haben offensichtlich die Aufgabe, durch eine spezielle Anreicherung das darunterliegende Gewebe vor Eindringlingen von außen zu schützen. Diese Zellen sind meistens darauf spezialisiert, Phenole zu bilden. In Hinblick auf Verteidigungsstrategien können pflanzliche Abwehrstoffe entweder schon vor einer Infektion vorliegen (präformierte Substanzen), um ein Eindringen von Erregern zu verhindern, oder sie werden erst nach erfolgter Infektion gebildet, um den Schaden zu begrenzen (postinfektionelle Substanzen). Zur letzteren Gruppe gehören die Phytoalexine. Diese werden meist 6-10 h nach einer Infektion neu gebildet. Außer bei Infektionen kann eine Neusynthese der Abwehrstoffe auch schon durch Streß oder Verwundung ausgelöst werden. Auffallend ist immer wieder, daß die Phenolzone auf wenige Zellen begrenzt stets in unmittelbarer Umgebung der Infektionsstellen vorgefunden werden kann. Der sehr abrupte Übergang von einer Abgrenzungszone zum gesunden Gewebe ist dabei bemerkenswert. Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß Phenole für eine direkte wie für eine induzierende Wirkung des Extrakts verantwortlich sein könnten. Für ein direktes Einwirken konnte die Penetration in das Blattinnere beobachtet

werden, die Färbung von Konidien durch An- und Einlagerung von Phenolen war ebenso zu bewerten. Induzierte Phenole könnten aber auch aus dem Blatt an die Oberfläche gelangt sein. Ob primäre oder induzierte Phenole in Zusammenhang standen mit der Bildung von AOS, die eine Apoptose der Wirtszellen einleiten konnten, war nicht eindeutig zu klären. Die Tatsache, daß Flavanole infektionshemmend wirken und Läsionen verhindern können, wiesen darauf hin, daß Flavanole an der Keimungshemmung und -verzögerung beteiligt zu sein scheinen. Die Verbreitung der induzierten Flavanole, die an die Blattoberfläche transportiert wurden, war identisch mit den Applikationsorten des Extrakts. Eventuell ein Beweis dafür, daß die induzierende Wirkung des Extrakts bei bestimmten Signalsubstanzen sehr lokal begrenzt auftrat. Hinsichtlich **Keimfähigkeit** und **Keimverzögerung** von *S. fuliginea*-Sporen konnte gezeigt werden, daß die Keimungshemmung durch den Extrakt, kontinuierlich erfaßt ab dem Applikationszeitpunkt, stetig abnimmt. Die Extraktbehandlung führte nicht zum Absterben der Konidien, sondern nur zur Verzögerung der Keimung. Für die Keimschläuche konnten keine Unterschiede in Form und Länge festgestellt werden. Huger et al. (1990) konnten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Entwicklung großer Papillen an der Penetrationsseite des Pilzes zeigen. Die Haustorien wiesen deutlich Anzeichen degenerativer Prozesse in Form von übergroßen Vakuolen auf, ebenso einen autolytischen Schwund des Cytoplasmas und Veränderungen in der Zellwand. Eine indirekte Wirkung auf Konidienkeimung und Myzelwachstum eines Pilzes durch externe Zugabe von Substanzen oder durch Induktion wurde von Joseph et al. (1998) und Jacks et al. (1999) beschrieben. Externes  $H_2O_2$  hemmte die Keimung in einer Sporensuspension und das vegetative Wachstum. Keimende Konidien waren empfindlicher als ruhende. Die Resistenz ruhender Konidien könnte auf  $H_2O_2$ -Abbau beruhen, CAT-Aktivität vorausgesetzt. Ruhende Konidien besitzen dickere Wände als die Keimschläuche. Induzierte Erhöhung der POX-Aktivität könnte für den Pilz nachteilig sein, da ab einer gewissen Enzymaktivität die gebildete  $H_2O_2$ -Menge antifungal wirkt, denn NADH oder NADPH bildet in Anwesenheit von POX und Sauerstoff  $H_2O_2$  (Peng & Kuć 1992). Im System Gurke / *S. fuliginea* nach Induktion mit *R. sachalinensis*-Extrakt war gleichzeitig mit der Keimverzögerung die CAT-Aktivität erhöht, die eventuell als Schutz für die noch nicht ausgekeimten Konidien diene. Andererseits war auch die POX-Aktivität gestiegen; wieweit diese für die Bildung antifungal wirkender  $H_2O_2$ -Konzentrationen ausreichte, ist nicht geklärt. Es ist seit längerem bekannt, daß das Mikroklima an der Kontaktfläche zwischen Pflanzen und Atmosphäre gänzlich anders sein kann als das der Umgebungsluft, und daß dies Mikroorganismen beeinflussen kann (Burrage 1976). Aus diesem Grund erfolgten pH-Messungen, um die Blattoberflächenmikroökologie zu erfassen. Der relativ niedrige pH-Wert der Oberfläche macht die Pflanzen gegen einige Krankheiten immun und stimuliert andere. Frühere Messungen zeigten, daß der **pH-Wert** nicht konstant ist, sondern dynamisch verlaufen und Extremwerte annehmen kann. Kleinere Schwankungen werden durch ständigen Austausch zwischen Oberflächenflüssigkeit und Umgebung, insbesondere mit dem  $CO_2$  der Atmosphäre, und durch Ionenaustausch und Diffusion in das und aus dem Blattinneren ausgeglichen. Auffallend war auch hier, daß durch die fehlende Eigenwirkung des Extrakts ein Absenken des pH ausbleibt, eher sogar in den ersten 24 h nach Extrakt-Applikation

dieser das Milieu stark heraufhebt. Dies kann die geringfügig hemmende Wirkung des Extraktes auf die Pilzsporen erklären. Durch die Angaben von Oertli et al. (1977) wird diese Aussage gestützt, wonach die Sporenkeimung sowohl durch schon vorhandene Hemmstoffe in der Pflanze als auch durch neu von der Pflanze synthetisierte Substanzen (Phytoalexine) als Reaktion auf jegliche vorhergehende Behandlung verhindert werden kann. Generell müssen auch pH-Veränderungen mit Ionentransportreaktionen erklärt werden. Während der Photosynthese werden Bicarbonat-ionen von der Zellwand im Austausch mit Hydroxylionen aufgenommen. Durch Änderung der Konzentration an stärkeren Anionen erhöht sich der pH in der Zellwand und an der Blattoberfläche. Desweiteren zeigten Tukey (1971) und Godfrey (1976), daß wesentliche Mengen an anorganischem und organischem Material durch die Membranen der Pflanzen permeieren können. Zusammensetzung und Konzentration dieser abgegebenen Lösungen charakterisieren die Blattoberflächenmikroökologie, indem sie den pH und die Puffer-kapazität bestimmen. Zusammenfassend die Veränderungen der Enzymaktivitäten, des ROS-Metabolismus und des pH-Milieus (Tab. 2).

**Tab. 2:** Übersicht über die von *R. sachalinensis*-Extrakt induzierten Reaktionen ohne / mit *S. fuliginea*

	<i>R. sachalinensis</i>			<i>R. sachalinensis</i> + <i>S. fuliginea</i>		
<b>Merkmal</b>	Stärke	Erhöhung nach x Stunden	Maximum nach x Stunden	Stärke	Erhöhung nach x Tagen	Maximum nach x Tagen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	++	1	n. g.	n. g.	n. g.	n. g.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	++	6	6	-	-	-
NO	++	> 1	48	++	> 2	5
POX	++	4	8	++	1	5
CAT	++	24	24	++	1	2
SOD	++	> 7	8	+	4	4
GR	++	> 2	8	++	> 3	5
GT	++	> 2	8	-	-	-
CHI	+	> 2	6	+	1	1
pH	+	> 24	72	+	> 1	3

n. g. = nicht gemessen  
- = keine Erhöhung

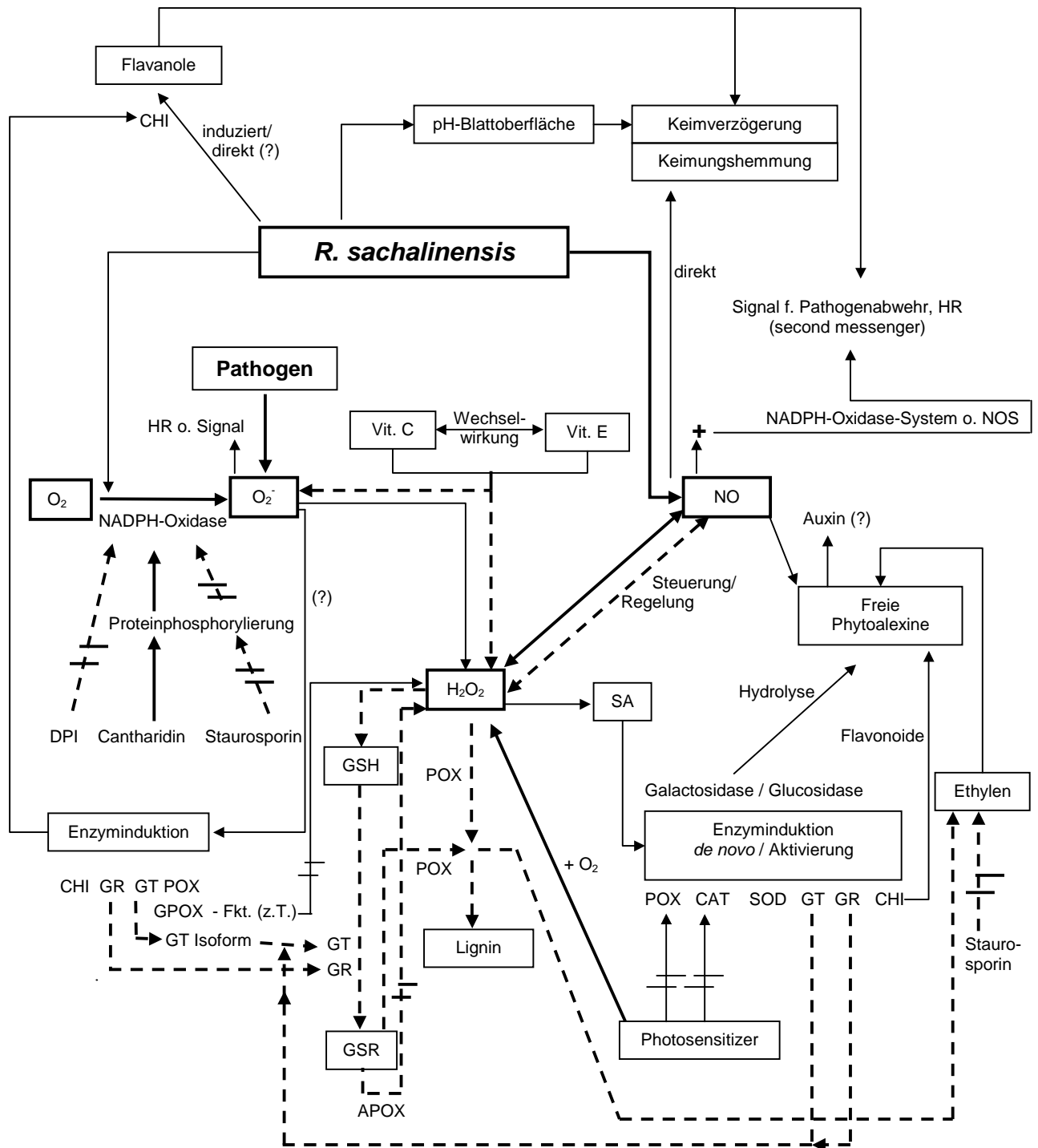
+ = schwache Erhöhung  
++ = starke Erhöhung



#### 4.9 Ausblick

Nach Abschluß der Untersuchungen zur Induzierten Resistenz besteht noch Forschungsbedarf in einigen Richtungen: I) Die beschriebenen Reaktionen (SAR, ISR) und Abwehrmechanismen sollten in ihren Einzelheiten besser verstanden werden, indem ihre Wirkungsweisen auf molekularer, biochemischer, physiologischer, zellulärer, integriert-pflanzlicher und pflanzenpathologischer Ebene bearbeitet werden. II) Die Wirkungsweise von bekannten Induktoren in verschiedenen Pflanzen (Sorten, Spezies) gegen bestimmte Pathogene sollten zum besseren Verständnis in Modellorganismen untersucht und in die Praxis übertragen werden. III) Einzelne Signale und Signaltransduktionen müssen detaillierter herausgestellt werden. IV) Die Dauer und die Geschwindigkeit von Induktion und Abwehr müssen geklärt werden. V) Die Identifizierung und die Aufklärung neuer Signalketten sollten weiter fortgeführt werden. VI) Auf züchterischer Ebene sind transgene Pflanzen in die Praxis zu überführen, und Marker-Gene für Abwehrreaktionen sollten gesucht und entwickelt werden. Die Wirkung von Pflanzenschutzmitteln in Kombination mit Induktoren müßte mehr Beachtung finden, ebenso die Suche nach neuen Induktoren jeglicher Art.

Zur Klärung der Signaltransduktionskette von *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt wurden abschließend nun die einzelnen untersuchten Kriterien in einem Reaktionsmodell zusammengesetzt (Abbildung 44).



**Abb. 44:** Beteiligte Reaktionen (gestrichelte Linie = abbauende Prozesse; durchgestrichene Linie = Unterbindung der Reaktionen; durchgezogene Linie = aufbauende Prozesse, Erhöhung, Förderung) bei der Induktion durch *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt im System Gurke / *Sphaerotheca fuliginea* unter Berücksichtigung des ROS-Metabolismus.

## 5 Zusammenfassung

Die Untersuchungen trugen zu einer neuen Sichtweise über das Phänomen der Induzierten Resistenz bei. Ein wesentliches Ergebnis dabei war, daß es nicht einen einzelnen Mechanismus der Induzierten Resistenz gibt, sondern alternative Wege, die über unterschiedliche Induktoren oder äußeren Streß induziert werden können. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Frage zu klären, warum der Extrakt aus *Reynoutria sachalinensis* insbesondere gegen Echte Mehltaupilze wirkt und welche einzelnen Reaktionen dazu in der Pflanze ablaufen. Desweiteren sollte untersucht werden, ob die aktivierten Substanzen oder Enzyme einzelne Glieder der Signaltransduktionskette oder eher unabhängig voneinander fungierende Signalstoffe sind.

1. Untersuchungen zum  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Metabolismus in Gurke und Gerste ließen einen oxidativen Burst erkennen, ausgelöst durch die induzierende Wirkung der untersuchten Induktoren, besonders herausragend bei *R. sachalinensis*-Extrakt mit einer nach 6 h zehnfach höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion als in der Kontrolle. Basierend auf den Ergebnissen von Tissue-Printings, die es ermöglichten, diesen oxidativen Burst qualitativ im Gewebe zu detektieren, war sogar davon auszugehen, daß intrazellulär im Gewebe ein Mehrfaches der extrazellulär gemessenen Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorlag. Die Bildung von  $\text{O}_2^-$  konnte bereits nach einstündiger Inkubation der Gurkenblätter im Extrakt nachgewiesen werden.

2. In anschließenden Untersuchungen wurde bewiesen, daß das Radikal Stickoxid (NO) eine Bedeutung in der Wirkungskette für die IR durch *R. sachalinensis*-Extrakt und Bion hatte. Ein zeitlich sehr früh gesetztes NO-Signal könnte allein ein Regulator für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Akkumulation sein, aber auch cytotoxische Effekte hervorrufen, bedingt durch Synergismus von NO und O-Radikalen. Andererseits könnte NO-Bildung in Kombination mit einer Pathogenentwicklung protektiv wirken, d. h. das NO-Signal würde eine Abwehr gegen den pathogenen Pilz einleiten.

3. In verschiedenartigen Biotests wurde der Effekt von Radikalfängern,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Inhibitoren und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stimulanzien/-Produzenten untersucht. Dabei konnten die Stimulanzien Cantharidin und Rhodamin B in Gurkenpflanzen die resistenzinduzierende Wirkung von *R. sachalinensis* gegenüber *S. fuliginea* erhöhen. Umgekehrt bewirkten die zum Einsatz gekommenen Radikalfänger Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol in mit Extrakt induzierten Gurken einen verstärkten Befall mit dem Pathogen. Als Vertreter der Inhibitoren, die in die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingriffen, wurden Staurosporin, DPI und Allopurinol eingesetzt, von denen nur Allopurinol keinen Einfluß auf die resistenzinduzierende Wirkung von *R. sachalinensis*-Extrakt in Gurken hatte. Damit konnte die Beteiligung einer Xanthinoxidase an der Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgeschlossen werden. Zugleich war damit die Beteiligung von Proteinkinase und NADPH-Oxidase zur Bildung von  $\text{O}_2^-$  nachgewiesen.

In Tabelle 3 zusammenfassend ein Überblick über die Wirkungsweisen der einzelnen Stoffgruppen.

**Tab. 3:** Übersicht über die Wirkung der einzelnen Substanzen

<u>Radikalfänger / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inhibitoren</u>	I R	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Vitamin C	■	
Vitamin E	■	□
Staurosporin (Proteinkinase-Inhibitor)	■	□
Allopurinol (Xanthinoxidase-Inhibitor)	✱	
DPI (NADPH-Oxidase-Inhibitor)	■	
<u>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produzenten / -Stimulanzen</u>		
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> extern	✚	
Cantharidin (Proteinphosphatase-Inhibitor)	✚	
Rhodamin B (redoxaktiver Farbstoff)	✚	

Erklärung:

- ✚ vermehrte Induzierte Resistenz (IR)      ■ verminderte Induzierte Resistenz  
 ✱ ohne Einfluß      □ Reduzierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -Konzentration

4. Untersuchungen von spezifischen Enzymaktivitäten zeigten, daß die zeitlichen Abläufe der Aktivitäten von am Auf- oder Abbau des oxidativen Bursts mitwirkenden Enzymen sehr unterschiedlich waren. Der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Burst erfolgte ab 6 h nach Induktion mit *R. sachalinensis*, Phycion, Bion und DCSA. Sowohl POX (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abbau und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aufbau) als auch SOD (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aufbau), GR (Regeneration von Antioxidantien) und GT (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenger) wiesen innerhalb der ersten 6 bis 8 Stunden nach Induktorbehandlung erhöhte Aktivität auf. *S. fuliginea*-Infektionen allein zeigten bei fast allen Enzymen (außer SOD) parallel zur Pathogenentwicklung verlaufende Aktivitäten. In Gurkenpflanzen, die vor Inokulation mit Extrakt induziert waren, waren die Enzyme aktiviert, abhängig von der Stärke des Einflusses, die der Induktor ausübte.

5. Histologische Untersuchungen an Gerste und Gurke zu den induzierenden Wirkungen der verschiedenen Induktoren ergaben ein konträres Bild. Im System Gerste / Echter Gerstenmehltau gab es kein allgemeines Erscheinungsbild der IR, das für *R. sachalinensis*-Extrakt, Bion und DCSA gleichermaßen galt. In Primärblättern wurden nach Extrakt-Applikation verstärkt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Papillen gebildet, während DCSA oder Bion sowohl HR als auch Papillenbildung förderte. Im System Gurke / Echter Gurkenmehltau veranlaßte der Extrakt die Bildung sowohl von Papillen als auch von HR-Zellen als Abwehrmechanismus,

während Bion vorwiegend die Entstehung von Papillen als effektive Pathogenabwehr unterstützte.

6. Die Frage nach einer unterschwelligen HR durch *R. sachalinensis*-Extrakt wurde durch den Einsatz von Vital- und Letalfarbstoffen näher untersucht. Die photometrische Quantifizierung der Vitalität bzw. Mortalität des induzierten Blattgewebes ergab eine geringfügige Zunahme von absterbendem Gewebe im Zeitraum von 14 Tagen. Diese war höchstwahrscheinlich mit den makroskopisch sichtbaren lokalen Nekrosen 10 Tage nach punktförmiger Applikation des Extrakts identisch.

7. Untersuchungen der Beteiligung von sekundären Pflanzenstoffen an der induzierenden oder direkten Wirkung des Extrakts ließen darauf schließen, daß die Gruppe der Phenole, insbesondere Catechin und/oder Proanthocyanidin, einen Einfluß hatte. Flavanole waren primär in den Induktorlösungen nicht enthalten, wurden aber offenbar während der Induktion gebildet und waren an der Abwehr beteiligt.

8. Eine indirekte Erhöhung des pH auf der Blattoberfläche, die nach wenigen Tagen wieder ausgeglichen war, ließ sich mit *R. sachalinensis*-Extrakt beobachten. Der für optimale Konidienkeimung notwendige pH-Bereich bzw. die apoplastische Konzentration an Zellexudaten konnte so eventuell erst verzögert erreicht werden. Direkte Wirkung des Extrakts war hierbei nach quantitativer Erfassung der Keimfähigkeit nicht gänzlich auszuschließen. Gleiches galt für Bion, wenn auch in geringerem Maß.

9. Mittels isoelektrischer Fokussierung konnte eine zweite GT-Form nachgewiesen werden, hervorgerufen durch Induktion mit einem 1 % *R. sachalinensis*-Extrakt. Diese war im Bereich von pH 3,6 zu erkennen. Dies sprach für eine umfangreichere Funktion von GT z. B. bei der Beseitigung von Radikalen, die beim oxidativen Burst entstanden sind.

## 6 Literaturverzeichnis

**ABBOTT, W. S. (1925):** A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265-267

**ÁDÁM, A., FARKAS, T., SOMLYAI, G., HEVESI, M. & KIRÁLY, Z. (1989):** Consequence of  $O_2^-$  generation during a bacterically induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34, 13-26

**ÁDÁM, A. L., GALAL, A. A. & KIRÁLY, Z. (1992):** Effect of allopurinol treatment on hypersensitive responses induced by virus infections and a fungal elicitor preparation. *Növénytermelés* 41, 121-128 (in Hungarian with English summary and captions)

**ÁDÁM, A. L., GALAL, A. A., MANNINGER, K. & BARNA, B. (2000):** Inhibition of the development of leaf rust (*Puccinia recondita*) by treatment of wheat with allopurinol and production of a hypersensitive-like reaction in a compatible host. *Plant Pathology* 49, 317-323

**AEBI, H. (1974):** Katalase.

In: Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim

**AIST, J. R. & ISRAEL, H. W. (1986):** Autofluorescent and ultraviolet-absorbing components in cell walls and papillae of barley coleoptiles and their relationship to disease resistance. *Canadian Journal of Botany* 64, 266-272

**AIST, J. R. & BUSHNELL, W. R. (1991):** Invasion of plants by powdery mildew fungi, and cellular mechanisms of resistance.

In: Cole, G. T. & Hoch, H. C. (eds.) *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press, New York, London

**ALSCHER, R. G., BOWER, J. & ZIPFEL, W. (1987):** The basis for different sensitivities of photosynthesis to  $SO_2$  in two cultivars of pea. *Journal of Experimental Botany* 38, 99-108

**ALSCHER, R. G., DONAHUE, J. L. & CRAMER, C. L. (1997):** Reactive oxygen species and antioxidants: Relationship in green cells. *Physiologia Plantarum* 100, 224-233

**ALVAREZ, M. E. & LAMB, C. (1997):** Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance.

In: Scandalios, J. G. (ed.) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidants Defenses*. Cold Spring Harbor Monograph Series ed. Vol. 34, 815-839

**ALVAREZ, M. E., PENNELL, R. I., MEIJER, P. J., ISHIKAWA, A., DIXON, R. A. & LAMB, C. (1998):** Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92, 773-784

**ANDERSON, D. G., STAFFORD, H. A., CONN, E. E. & VENNESLAND, B. (1952):** The distribution in higher plants of triphosphopyridine nucleotide-linked enzyme systems capable of reducing glutathione. *Plant Physiology* 3, 675-684

**APOSTOL, I., HEINSTEIN, P. F. & LOW, P. S. (1989):** Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Physiology* 90, 109-116

**ARIOLI, T., HOWLES, P. A., WEINMAN, J. J. & ROLFE, B. G. (1994):** In: *Trifolium subterraneum*, chalcone synthase is encoded by a multigene family. *Gene* 138, 79-86

**ARMSTRONG, R. N. (1991):** Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function. *Chemical Research Toxicology* 4, 131-140

**ARRAS, L. (1998):** Untersuchungen zur antagonistischen und resistenzinduzierenden Wirksamkeit von *Bacillus thuringiensis* Berliner gegenüber pilzlichen und bakteriellen Pflanzenkrankheiten. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt

**ASADA, K. & TAKAHASHI, M. (1987):** Production and scavenging of active oxygen species in photosynthesis.

In: Kyle, D. J., Osmond, C. B. & Arntzen, C. J. (eds.) *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam

**ASADA, K. (1992):** Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85, 235-241

**AUH, C. K. & MURPHY, T. M. (1995):** Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiology* 107, 1241-1247

**AVDIUSHKO, S. A., YE, X. S. & KUĆ, J. (1993):** Detection of several enzymatic activities in leaf prints of cucumber plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42, 441-454

**AVDIUSHKO, S. A., YE, X. S., KUĆ, J. & HILDEBRAND, D. F. (1994):** Lipoxygenase in an abundant protein in cucumber exudates. *Planta* 193, 349-357

**AVER`YANOV, A. A. & LAPIKOVA, V. P. (1994):** Active oxygen and fungitoxicity of plant phenols. *Acta Horticulturae* 381, 336-339

**BAKER, C. J. & ORLANDI, E. W. (1995):** Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 299-321

**BAKER, C. J., DEAHL, K., DOMEK, J. & ORLANDI, E. W. (1998):** Oxygen metabolism in plant/bacteria interactions: effect of DPI on the pseudo-NAD(P)H oxidase activity of peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252, 461-464

**BATTLE, R. W., GAUNT, J. K. & LAIDMAN, D. L. (1976):** The effect of photoperiod on endogenous  $\gamma$ -tocopherol and plastochromanol in leaves of *Xanthium strumarium* L. (Cocklebur). *Biochemical Society Transactions* 4, 484

**BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I. (1971):** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44, 276-287

**BECKHOVE, U., KOGEL, K. H. & SCHMELZER, E. (1996):** Acquired resistance in barley: Early accumulation of the potentiometric dye DiOC<sub>6</sub> in cytoplasmatic aggregates beneath the primary germ tube of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* of cells of barley coleoptiles induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid.

In: Lyr, H., Russel, P. E. & Sisler, H. D. (eds.) *Intercept of the 11<sup>th</sup> International Symposium of Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Andover, 475-481

**BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A. & FREEMAN, B. A. (1990):** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 1620-1624

**BELL, T. A., ETCHELS, J. L. & SMART, W. W. G. (1965):** Pectinase and cellulase inhibitor from *Sericea* and certain other plants. *Botanical Gazette* 126, 40-45

- BENO-MOUALEM, D. & PRUSKY, D. (2000):** Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90 (5), 553-559
- BESTWICK, C. S., BROWN, I. R., BENNETT, M. H. & MANSFIELD, J. W. (1997):** Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209-221
- BESTWICK, C. S., BROWN, I. R. & MANSFIELD, J. W. (1998):** Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiology* 118, 1067-1078
- BÖCK, P. (1989):** Romeis - Mikroskopische Technik, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- BÖHMER, B., BRIELMAIER, U., DALCHOW, J., EHLE, H., JENNRICH, H., JÖRG, G., KASPERS, H., KÜHNE, H. & PLATE, H. P. (1986):** Richtlinie für die Prüfung von Fungiziden gegen Echte Mehltaupilze an Zierpflanzen. Nr. 4-2.4.1. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig (Hrsg.)
- BOHNERT, H. J. & JENSEN, R. G. (1996):** Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14, 89-97
- BOLWELL, G. P., BUTT, V. S., DAVIES, D. R. & ZIMMERLIN, A. (1995):** The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research* 23 (6), 517-532
- BOLWELL, G. P. & WOJTASZEK, P. (1997):** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51 (6), 347-366
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M. & INZÉ, D. (1994):** Superoxide dismutase in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13, 199-218
- BRADFORD, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- BRADLEY, D. J., KJELLBOM, P. & LAMB, C. J. (1992):** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30
- BRUCE, R. J. & WEST, C. A. (1989):** Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension-cultures of castor bean. *Plant Physiology* 91, 889-897
- BUCHENAUER, H. (1983):** Wirkungsweise moderner Fungizide in Pilzen und Kulturpflanzen. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 96, 427-457
- BUETTNER, G. R. & JURKIEWICZ, B. A. (1996):** Chemistry and biochemistry of ascorbic acid.  
In: Cadenas, E. & Packer, L. (eds.) *Handbook of Antioxidants*. Dekker, New York
- BURGENER, M., SUTER, M., JONES, S. & BRUNOLD, C. (1998):** Cyst(e)ine is the transport metabolite of assimilated sulfur from bundle-sheath to mesophyll cells in maize leaves. *Plant Physiology* 116, 11315-1322



**BURRAGE, S. W. (1976):** Aerial microclimate around plant surfaces.

In: Dickinson, C. H. & Preece, T. F. (eds.) Microbiology of aerial plant surfaces. Academic Press, London

**BUSHNELL, W. R., DUECK, J. & ROWELL, J. B. (1967):** Living haustoria and hyphae of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* with intact and partly dissected host cells of *Hordeum vulgare*. Canadian Journal of Botany 45, 1719-1732

**BUSHNELL, W. R. & BERGQUIST, S. E. (1974):** Aggregation of host cytoplasm and the formation of papilla and haustoria in powdery mildew of barley. Phytopathology 65, 310-318

**BUTT, V. S. (1980):** Direct oxidases and related enzymes.

In: Davies, D. D. (ed.) The Biochemistry of Plants. Vol. 2, Academic Press, New York

**CADENAS, E., SIMIC, M. G. & SIES, H. (1989):** Free Radical Research Comms. 6 (1), 11

In: Elstner, E. F. (ed.) Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Wien, Zürich

**CARREL, J. E. & EISNER, T. (1974):** Cantharidin: potent feeding deterrent to insects. Science 183, 755-757

**CARVER, T. L. W., INGERSON-MORRIS, S. M., THOMAS, B. J. & ZEYEN, R. J. (1995):** Early interaction during powdery mildew infection. Canadian Journal of Botany 73 (Supplement 1), 632-639

**CASPER, R. & MEYER, S. (1981):** ELISA-Verfahren zum Nachweis pflanzenpathogener Viren. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes (Braunschweig) 33, 50

**CHAI, H. B. & DOKE, N. (1987):** Systemic activation of  $O_2^-$  generating reaction, superoxide dismutase and peroxidase in potato plants in relation to induction of systemic resistance to *Phytophthora infestans*. Annals of the Phytopathological Society of Japan 53, 585-590

**CHANDRA, S. & LOW, P. S. (1995):** Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 4120-4123

**CHARLTON, A. J., BAXTER, N. J., HASLAM, E. & WILLIAMSON, M. P. (1998):** Salivary proteins as a defence against dietary tannins.

In: Armado, R. (ed.) Polyphenols in Food. European Communities, Aberdeen, Scotland, 179-187

**CHEN, Z., MALAMY, J., HENNING, J., CONRATH, U., SÁNCHEZ-CASAS, P., SILVA, H., RICIGLIANO, J. & KLESSIG, D. F. (1995):** Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plants defence responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 4134-4137

**CLARK, A. G. (1982):** A direct method for the visualization of glutathione S-transferase activity in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 123, 147-150

**COHEN, Y. (1994):** 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. Physiological and Molecular Plant Pathology 44, 273-288

**COLEMAN, J. O. D., RANDALL, R. & BLAKE-KALFF, M. M. A. (1997):** Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. Plant Cell and Environment 20, 449-460

- COPEMAN, R. J. (1969):** Histological and cytochemical changes in tobacco infected by *Pseudomonas solanacearum*. Dissertation, University of Wisconsin, Madison
- CROFT, K. P. C., VOISEY, C. R. & SLUSARENKO, A. J. (1990):** Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36, 49-62
- CUETO, M., HERNANDEZ-PERERA, O., MARTIN, R., BENTURA, M. L., RODRIGO, J., LAMAS, S. & GOLVANO, M. P. (1996):** Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters* 398, 159-164
- CVIKROVA, M., HRUBCOVA, M., MERAVY, L. & POSPISIL, F. (1988):** Changes in the content of phenolic substances during the growth of *Nicotiana tabacum* cell suspension culture. *Biologia Plantarum* 30, 185-192
- DAAYF, F., SCHMITT, A. & BÉLANGER, R. R. (1995):** The effects of plant extract of *Reynoutria sachalinensis* on powdery mildew development and leaf physiology of long English cucumber. *Plant Disease* 79, 577-580
- DAAYF, F., SCHMITT, A. & BÉLANGER, R. R. (1997):** Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiology* 113, 719-727
- DANGL, J. L. (1998):** Plants just say NO to pathogens. *Nature* 394, 525-527
- DELLEDONNE, M., XIA, Y., DIXON, R. A. & LAMB, C. J. (1998):** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588
- DEMSEY, D. M. A. & KLESSIG, D. F. (1994):** Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. *Trends in Cell Biology* 4, 334-338
- DHINDSA, R. S., PLUMB-DHINDSA, P. & THORPE, T. A. (1981):** Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32 (126), 93-101
- DIRSCH, V. M., GERBES, A. L. & VOLLMAR, A. M. (1998):** Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor  $\kappa$ B. *Molecular Pharmacology* 53, 402-407
- DIXON, R. A. & LAMB, C. J. (1990):** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology* 41, 339-367
- DOKE, N. (1983):** Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology* 23, 345-357
- DOKE, N. (1997):** The oxidative burst role in signal transduction and plant stress. In: Scandalios, J. G. (ed.): *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 785-813
- DURNER, J., WENDEHENNE, D. & KLESSIG, D. F. (1998):** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10328-10333

- DURNER, J., GOW, A. J., STAMLER, J. S. & GLAZEBROOK, J. (1999):** Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (25), 14206-14207
- EDWARDS, R. & OWEN, W. J. (1988):** Regulation of glutathione S-transferases of *Zea mays* in plant and cell cultures. *Planta* 175, 99-106
- EDWARDS, E. A., RAWSTHORNE, S. & MULLINEAUX, P. M. (1990):** Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278-284
- ELSTNER, E. F. & HEUPEL, A. L. (1976):** Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish. *Planta* 130, 175-180
- ELSTNER, E. F., OSSWALD, W. F., VOLPERT, R. & SCHEMPP, H. (1994):** Phenolic antioxidants. *Acta Horticulturae* 381, 304-335
- ERIN, A. N., SKRYPIN, V. V. & KAGAN, V. E. (1985):** *Biochim. Biophys. Acta* 815, 209  
In: Elstner, E. F. (ed.) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Wien, Zürich
- ESHDAT, Y., HOLLAND, D., FALTIN, Z. & BEN-HAYYIM, G. (1997):** Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum* 100, 234-240
- ESUMI, H. & TANNENBAUM, S. T. (1994):** U.S.-Japan cooperative cancer research program: seminar on nitric oxide synthase and carcinogenesis. *Cancer Research* 54, 297-301
- FEELISCH, M. & NOACK E. A. (1987):** *European Journal of Pharmacology* 139, 19  
In: Murphy, M. E. & Noack, E. (eds.) *Nitric oxide assay using hemoglobin method*. *Methods in Enzymology* 233, 240-251
- FEELISCH, M. (1998):** The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358 (1), 113-122
- FEIERABEND, J. & ENGER, J. (1986):** Photoinactivation of catalase *in vivo* and in leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251, 567-576
- FEIERABEND, J., SCHAAN, C. & HERTWIG, B. (1992):** Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiology* 100, 1554-1561
- FELIX, G., GROSSKOPF, D. G., REGENASS, M. & BOLLER, T. (1991):** Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 8831-8834
- FELIX, G., REGENASS, M. & BOLLER, T. (1993):** Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant Journal* 4, 307-316
- FEUCHT, W., DIRR, U., TREUTTER, D. & SANTOS-BUELGA, T. (1997):** Leaching properties of antimicrobial *Prunus* phenols. *Journal of Plant Diseases and Protection* 104, 370-379

- FEUCHT, W., SCHWALB, P. & ZINKERNAGEL, V. (2000):** Complexation of fungal structures with monomeric and oligomeric flavanols. *Journal of Plant Diseases and Protection* 107 (1), 106-110
- FLURY, T., WAGNER, E. & KREUZ, K. (1996):** An inducible glutathione S-transferase in soybean hypocotyl is localized in the apoplast. *Plant Physiology* 112, 1185-1190
- FOOTE, C. S. (1968):** Mechanisms of photosensitized oxidation. *Science* 162, 963-969
- FORKMANN, G. & KUHN, B. (1979):** Genetic control of chalcone isomerase activity in anthes of *Petunia hybrida*. *Planta* 144, 189-192
- FOYER, C. H. & HALLIWELL, B. (1976):** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25
- FOYER, C. H., DESCOURVIÈRES, P. & KUNERT, K. J. (1994):** Protection against oxygen radicals: An important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment* 17, 507-523
- FOYER, C. H., LELANDIS, M. & KUNERT, K. J. (1994):** Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92, 696-717
- FOYER, C. H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J. F. & SCOTT, I. M. (1997):** Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100, 241-254
- FRAHRY, G. & SCHOPFER, P. (1998):** Inhibition of  $O_2^-$  reducing activity of horseradish peroxidase by diphenyleneiodonium. *Phytochemistry* 48, 223-227
- FREAR, D. S. & SWANSON, H. R. (1970):** Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2-s-triazine) glutathione: Partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochemistry* 9, 2123-2132
- FREIALDENHOVEN, A., PETERHÄNSEL, C., KURTH, J., KREUZALER, F. & SCHULZE-LEFERT, P. (1996):** Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. *The Plant Cell* 8, 5-14
- FRENZEL, M. & DETTNER, K. (1995):** Gnitzen (Diptera: *Ceratopogonidae*) und Cantharidin. Die Gier nach einem außergewöhnlichen Naturstoff. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Angewandte Entomologie* 10 (1-6), 681-684
- FRITZ, I. (1996):** Physiologische Wirkung von Resistenzinduktoren: Primäre und sekundäre Reaktionen im Wirt-Pathogen-System Gurke / Echter Gurkenmehltau. Dissertation, Technische Universität Darmstadt
- FRYER, M. J. (1993):** The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant, Cell and Environment* 15, 381-392
- FUKUZAWA, K. (1987):** In: Hayaishi, O. & Mino, M. (eds.) *Clinical and nutritional aspects of Vitamin E*. Elsevier Science Publishers B. V. 25
- GAFF, D. F. & OKONG'O-OGOLA, O. (1971):** The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. *Journal of Experimental Botany* 22, 756-758
- GILLHAM, D. J. & DODGE, A. D. (1986):** Hydrogen peroxide-scavenging system within pea chloroplasts: a quantitative study. *Planta* 167, 246-251

**GLAZENER, J. A., ORLANDI, E. W. & BAKER, C. W. (1996):** The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiology* 110, 759-763

**GODFREY, B. E. S. (1976):** Leachates from aerial parts of plants and their relation to plant surface microbial populations.

In: Dickinson, C. H. & Preece, T. F. (eds.) *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. Academic Press, London

**GOLDBERG, D. M. & SPOONER, R. J. (1987):** Glutathione reductase.

In: Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methoden der enzymatischen Analyse* Vol. III, Verlag Chemie, Weinheim

**GOLDSTEIN, J. L. & SWAIN, T. (1965):** The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4, 185-192

**GOODMAN, R. N., KIRALY, Z. & WOOD, R. K. S. (1986):** *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press, Columbia

**GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. & RYALS, J. (1996):** Benzoethiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643

**GORBUNOV, N. V., KAGAN, V. E., AIEKSEEV, S. M. & ERIN, A. N. (1988):** Role of the isoprenoid chain of lateral mobility of  $\alpha$ -tocopherol in the lipid bilayer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 112, 946

**GRANT, M., BROWN, I., ADAMS, S., KNIGHT, M., AINSLIE, A. & MANSFIELD, J. (2000):** The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 23 (4), 441-450

**GROSSMAN, S. & WAKSMAN, E. G. (1984):** *International Journal of Biochemistry* 16 (3), 281

In: Elstner, E. F. (ed.) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Wien, Zürich

**GUTTRIDGE, J. M. C. (1978):** The membrane effects of vitamin E, cholesterol and their acetates on peroxidative susceptibility. *Research Communications of Chemical Pathology and Pharmacology* 22, 563-572

**HABIG, W. H., PABST, M. J. & JACOBY, W. B. (1974):** Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22), 7130-7139

**HAGERMAN, A. E., RICE, M. E. & RICHARD, N. T. (1998):** Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and polymeric procyanidin. *Third Tannin Conference, Bend, Oregon (USA)*, 20-25

**HAJRI, A., METZGER, E., VALLAT, F., COFFY, S., FLATTER, E., EVRARD, S., MARESCAUX, J. & APRAHAMIAN, M. (1998):** Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: *in vivo* and *in vitro* studies. *British Journal of Cancer* 78 (7), 841-849

**HALLIWELL, B. (1974):** Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problems of living with oxygen. *New Phytologist* 73, 1075-1086

- HALLIWELL, B. (1974 a):** Marker enzymes of plant cell organelles.  
In: Reid, E. (ed.) Methodological Developments in Biochemistry. Vol. IV, Longmans, London
- HALLIWELL, B. (1984):** Oxygen-derived species and herbicide action. *Physiologia Plantarum* 15, 21-24
- HAMMERSCHMIDT, R. (1999):** Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 77-84
- HARGREAVES, J. A. & BAILEY, J. A. (1978):** Phytoalexin production by hypocotyls of *Phaseolus vulgaris* in response to constitutive metabolites released by damaged bean cells. *Physiological Plant Pathology* 13, 89-100
- HASLAM, E. (1994):** Polyphenols - A case of biochemical co-evolution? *Acta Horticulturae* 381, International Symposium on natural phenols in plant resistance. Vol. I., 722-737
- HAUSLADEN, A. & STAMLER, J. S. (1998):** Nitric oxide in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10345-10347
- HAUSSMANN, H.-J. & WERRINGLOER, J. (1985):** Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 329 (Supplement), R 21  
In: Murphy, M. E. & Noack, E. (eds.) Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods in Enzymology* 233, 240-251
- HERGER, G., KLINGAUF, F., MANGOLD, D., POMMER, E. H. & SCHERER, M. (1988):** Die Wirkung von Auszügen aus dem Sachalin-Staudenknöterich, *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehltäupilze. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* (Braunschweig) 40, 56-60
- HERGER, G. & KLINGAUF, F. (1990):** Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed, *Reynoutria sachalinensis* (Polygonaceae). *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 55, 1007-1014
- HESS, J. L. (1993):** Vitamin E,  $\alpha$ -Tocopherol.  
In: Alscher, R. G. & Hess, J. L. (eds.) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida
- HICKS, M. & GEBICKI, J. M. (1981):** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 210 (1), 56  
In: Elstner, E. F. (ed.) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Wien, Zürich
- HILLE, R. & MASSEY, V. (1981):** Tight binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmac. Ther.* 14, 249-263
- HINDERER, W., NOÉ, W. & SEITZ, H. U. (1983):** Differentiation of metabolic pathways in the umbel of *Daucus carota*. *Phytochemistry* 22 (11), 2417-2420
- HINDERER, W. & SEITZ, H. U. (1985):** Chalcone synthase from cell suspension cultures of *Daucus carota* L.. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240 (1), 265-272
- HIRATA, K. & TOGASHI, K. (1957):** Some observation on the relation between the penetration hypha and haustorium of the barley mildew and host cell. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 22, 230-236

**HOFFMANN, G. M., NIENHAUS, F., POEHLING, H.-M., SCHÖNBECK, F., WELTZIEN, H. C. & WILBERT, H. (1994):** Lehrbuch der Phytomedizin. 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin

**HOLLIDAY, M. J., KEEN, N. T. & LONG, M. (1981):** Cell death patterns and accumulation of fluorescent material in the hypersensitive response of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Physiological Plant Pathology* 18, 279-287

**HOSSAIN, M. A., NAKANO, Y. & ASADA, K. (1984):** Monodehydroascorbate reductase in spinach chloroplasts and its participation in regeneration of ascorbate for scavenging hydrogen peroxide. *Ibid.* 25, 385-395

**HÜCKELHOVEN, R., FODOR, J., PREIS, C. & KOGEL, K. H. (1999):** Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119, 1251-1260

**HUGER, A., HERGER, G. & KLINGAUF, F. (1990):** Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Auswirkungen von Extrakten des Sachalin-Staudenknöterichs (*Reynoutria sachalinensis*) auf Haustorien des Echten Mehltaus an Gurken. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Jahresbericht 1989

**HUGUET, A. I., MÁÑEZ, S. & ALCARAZ, M. J. (1990):** Superoxide scavenging properties of flavonoids in a non-enzymic system. *Zeitschrift für Naturforschung* 45 c, 19-24

**INOUE, M., NISHIMURA, H., LI, H. H. & MIZUTANI, J. (1992):** Allelochemicals from *Polygonum sachalinensis* Fr. Schm. (Polygonaceae). *Journal of Chemical Ecology* 18, 1833-1840

**IRVING, H. R. & KUĆ, J. A. (1990):** Local and systemic induction of peroxidase, chitinase and resistance in cucumber plants by  $K_2HPO_4$ . *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37, 355- 366

**JABS, T., TSCHÖPE, M., COLLING, C., HAHLBROCK, K. & SCHEEL, D. (1997):** Elicitor-stimulated ion fluxes and  $O_2^-$  from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4800-4805

**JACKS, T. J., DE LUCCA, A. J. & MORRIS, N. M. (1999):** Effects of chloroperoxidase and hydrogen peroxide on the viabilities of *Aspergillus flavus* conidiospores. *Molecular and Cellular Biochemistry* 195, 169-172

**JAROSCH, B., BECKHOVE, U., SCHIFFER, R., HEISE, S., KREUZALER, F. & KOGEL, K. H. (1997):** A common basis of genetically based and induced resistance in cereals: New approaches for the assessment of reliable assays for chemical inducers.

In: Dehne, H. W., Adam, G., Diekmann, M., Frahm, J., Mauler-Machnik, A. & Van Halteren, P. (eds.) *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 229-235

**JENSEN, H. P., CHRISTENSEN, E. & JØRGENSEN, J. H. (1992):** Powdery mildew resistance genes in 127 northwest European spring barley varieties. *Plant Breeding* 108, 210

**JOSEPH, L. M., KOON, T. T. & MAN, W. S. (1998):** Antifungal effects of hydrogen peroxide and peroxidase on spore germination and mycelial growth of *Pseudocercospora* species. *Canadian Journal of Botany* 76, 2119-2124

- KALIX, S. (1996):** Vergleichende Untersuchungen über die Wirkungsmechanismen verschiedener Resistenzinduktoren gegenüber unterschiedlichen Schaderregern bei *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. Dissertation Universität Stuttgart-Hohenheim
- KAPLAN, J. C. (1968):** Electrophoretic study of glutathione reductase in human erythrocytes and leucocytes. *Nature* 217, 256-258
- KARADE, V. M. & SAWANT, D. M. (1999):** Effect of some plant extracts on the spore germination of *Alternaria alternata*. *Plant Disease Research* 14 (1), 76-77
- KAWANO, T., SAHASHI, N., TAKAHASHI, K., UOZUMI, N. & MUTO, S. (1998):** Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiology* 39 (7), 721-730
- KERBY, K. & SOMERVILLE, S. C. (1989):** Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35, 323-337
- KESSMANN, H., OOSTENDORP, M., RUESS, W., STAUB, T., KUNZ, W. & RYALS, J. (1996):** Systemic activated resistance - a new technology for plant disease control. *Pesticide Outlook*, 10-13
- KIBA, A., MIYAKE, C., TOYODA, K., ICHINOSE, Y., YAMADA, T. & SHIRAISHI, T. (1997):** Superoxide generation in extracts from isolated plant cell walls is regulated by fungal signal molecules. *Phytopathology* 87 (8), 846-854
- KLESSIG, D. F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D. A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J. M., SHAH, J., ZHANG, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E. & SILVA, H. (2000):** Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16), 8849-8855
- KOGA, H., MAYAMA, S. & SHISHIYAMA, J. (1980):** Correlation between the deposition of fluorescent compounds in papillae and resistance in barley against *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Canadian Journal of Botany* 58, 536-541
- KOGA, H., ZEYEN, R. J., BUSHNELL, W. R. & AHLSTRAND, G. G. (1988):** Hypersensitive cell death, autofluorescence, and insoluble silicon accumulation in barley leaf epidermal cells under attack by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 395-409
- KOGA, H., BUSHNELL, W. R. & ZEYEN, R. J. (1990):** Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Canadian Journal of Botany* 68, 2344-2352
- KOGEL, K. H., BECKHOVE, U., DRESCHERS, J., MÜNCH, S. & ROMMÉ, Y. (1994):** The resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology* 106, 1269-1277
- KOGEL, K. H. & HÜCKELHOVEN, R. (1999):** Superoxide generation in chemically activated resistance of barley in response to inoculation with the powdery mildew fungus. *Journal of Phytopathology* 147, 1-4



- KOVATS, K., BINDER, A. & HOHL, H. R. (1991):** Cytology of induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Planta* 183, 484-490
- KOWALEWSKI, A. & SCHMITT, A. (1993):** Pflanzenextrakte und ihre Verwendung in der Phytomedizin. *Gesunde Pflanzen* 45, 43-47
- KRIEG, F. (1992):** Einfluß der Nährstoffversorgung auf die Ozonanfälligkeit der Weinrebe (*Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir). Dissertation, ETH Zürich, Nr. 9787
- KUĆ, J. (1982):** Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32, 854-860
- KUNERT, K. J. (1984):** Herbicide induced lipid peroxidation in higher plants: the role of vitamin C.  
In: Bors, W., Saran, M. & Tait, D. (eds.) *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York
- LAI, M. T., WEINHOLD, A. R. & HANCOCK, J. G. (1968):** Permeability changes in *Phaseolus aureus* associated with infection by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 58, 240-245
- LAMB, C. & DIXON, R. A. (1997):** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Pathology and Molecular Biology* 48, 251-275
- LANGCAKE, P. & MCCARTHY, W. V. (1979):** The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18, 244-253
- LANGEN, G., HÜCKELHOVEN, R., BESSER, K., SCHAFFRATH, U. & KOGEL, K. H. (1998):** Eine vorläufige Bewertung der reaktiven Sauerstoffspezies bei Abwehrreaktionen von Getreide gegenüber pilzlichen Pathogenen. *Gesunde Pflanzen* 50 (7), 196-201
- LAWSON, C. G. R., DJORDJEVIC, M. A., WEINMAN, J. J. & ROLFE, B. G. (1994):** *Rhizobium* inoculation and physical wounding result in the rapid induction of the same chalcone synthase copy in *Trifolium subterraneum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7 (4), 498-507
- LEGENDRE, L., YUEH, Y. G., CRAIN, R. C., HADDOCK, N., HEINSTEIN, P. F. & LOW, P. S. (1993):** Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. *Journal of Biological Chemistry* 268, 24559-24563
- LESHEM, Y. Y. (1988):** Plant senescence processes and free radicals. *Free Radical Biology and Medicine* 5, 39-49
- LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R. A. & LAMB, C. (1994):** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593
- LIMPERT, E., ANDRIVON, D. & FELSENSTEIN, F. G. (1988):** Influence of different benzimidazole concentrations in agar medium on senescence of wheat leaf segments and on growth and sporulation of the wheat powdery mildew pathogen. *Journal of Plant Diseases and Protection* 95, 301-306
- LOW, P. S. & MERIDA, J. R. (1996):** The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. *Physiologia Plantarum* 96, 533-542
- MADAMANCHI, N. R. & ALSCHER, R. G. (1991):** Metabolic bases for differences in sensitivity of two pea cultivars to sulfur dioxide. *Plant Physiology* 97, 88-93

- MADAMANCHI, N. R., ANDERSON, J. V., ALSCHER, R. G., CRAMER, C. L. & HESS, J. L. (1992):** Purification of multiple forms of glutathione reductase from pea (*Pisum sativum* L.) seedlings and enzyme levels in ozone fumigated pea leaves. *Plant Physiology* 100, 138-145
- MAPSON, L. W. & GODDARD, D. R. (1951):** The reduction of glutathione by plant tissues. *Biochemical Journal* 49, 592-601
- MASSEY, V., KOMAL, H., PALMER, G. & ELION, G. B. (1970):** On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d]pyrimidines. *Journal of Biological Chemistry* 245, 2837-2844
- MATERN, H., GRIMMIG, B. & KNEUSEL, R. E. (1995):** Plant cell wall reinforcement in the disease resistance: molecular composition and regulation. *Canadian Journal of Botany* 73, 511-517
- MATSUZAWA, M., GRAZIANO, M. J. & CASIDA, J. E. (1987):** Endothal and cantharidin analogues: relation of structure to herbicidal activity and mammalian toxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35 (5), 823-829
- MAUCH, F. & DUDLER, R. (1993):** Differential induction of distinct glutathione S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiology* 102, 1193-1201
- MAY, M. J. & LEAVER, C. J. (1993):** Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiology* 103, 621-627
- MAYAMA, S. & SHISHIYAMA, J. (1978):** Localized accumulation of fluorescent compounds at penetration sites in barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological Plant Pathology* 13, 347-354
- McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1968):** The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 243, 5753-5760
- McCORD, J. M. & FRIDOVICH, I. (1969):** Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055
- McCORMICK, J. P. & CARREL, J. E. (1987):** Cantharidin biosynthesis and function in meloid beetles.  
In: Prestwich, G. D. & Blomquist, G. S. (eds.) *Pheromone Biochemistry*. Academic Press, Orlando
- McMURROUGH, I. & McDOWELL, J. (1978):** Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Analytical Biochemistry* 91, 92-100
- MECKEL, T. (2000):** Etablierung einer Methode zur *in vitro*-Quantifizierung der Aktivität ascorbatspezifischer Peroxidasen des C<sub>3</sub>/CAM-intermediären Halophyten *Mesembryanthemum crystallinum* L.. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt
- MEHDY, M. C. (1994):** Active oxygen species in plant defence against pathogens. *Plant Physiology* 105, 467-472
- MEHLHORN, H., LELANDIS, M., KORTH, H. G. & FOYER, C. H. (1996):** Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* 378, 203-206

- MÉTRAUX, J. P., AHL GOY, P., STAUB, T., SPEICH, J., STEINEMANN, A., RYALS, J. & WARD, E. (1991):** Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In: Hennecke, H. & Verma, D. P. S. (eds.) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, 432-439
- MITTLER, R. & ZILINSKAS, B. A. (1991):** Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology* 97, 962-968
- MIYAKE, C. & ASADA, K. (1992):** Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* 33, 541-553
- MIZUNO, M., KAMEI, M. & TSUCHIDA, H. (1998):** Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44 (4), 717-726
- MOCH, K. (2000):** Wirkmechanismen von Extrakten aus *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* an Gerste. Diplomarbeit Fachbereich Biologie, Universität Mainz
- MONCADA, S., PALMER, M. J. & HIGGS, E. A. (1991):** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43, 109-142
- MONTALBINI, P. & MARTE, M. (1972):** Relazione tra perossidasi, catecolo ossidasi e catalasi in foglie di fagiolo infette da *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint., in rapporto alla resistenza e alla suscettibilità. *Phytopathologia Mediterranea* 11, 37-41
- MONTALBINI, P. (1992 a):** Inhibition of hypersensitive response by Allopurinol applied to the host in the incompatible relationship between *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *Journal of Phytopathology* 134, 218-228
- MONTALBINI, P. (1992 b):** The inhibition of rust growth in Allopurinol-treated bean plants: indirect evidence for the involvement of xanthine oxidoreductase in the biotrophism of *Uromyces phaseoli*. *Journal of Phytopathology* 135, 207-216
- MONTALBINI, P. (1993):** Xanthine oxidase activity in the susceptible and hypersensitive responses of tobacco leaves to tobacco mosaic virus infection. *Journal of Phytopathology* 139, 177-186
- MONTALBINI, P. & DELLA TORRE, G. (1995):** Allopurinol metabolites and xanthine-accumulation in Allopurinol-treated tobacco. *Journal of Plant Physiology* 110, 621-629
- MOREL, J. P. & DANGL, J. L. (1997):** Plant cell death in response to infection. *Cell Death and Differentiation* 4, 671-683
- MOUSTAFA, E. & WONG, E. (1967):** Purification and properties of chalcone-flavone isomerase from soya bean seed. *Phytochemistry* 6, 625-632
- MÜLLER, L. A., GOODMAN, C. D., SILADY, R. A. & WALBOT, V. (2000):** AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology* 123, 1561-1570
- MURPHY, M. E. & NOACK, E. (1994):** Nitric oxide assay using hemoglobin method. *Methods in Enzymology* 233, 240-251

- MURPHY, T. M. & AUH, C. K. (1996):** The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiology* 110, 621-629
- MURPHY, M. P., PACKER, M. A., SCARLETT, J. L. & MARTIN, S. W. (1998):** Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *General Pharmacology* 31, 179-186
- NATHAN, C. & SHILOH, M. U. (2000):** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16), 8841-8848
- NEELY, W. C., MARTIN, J. M. & BARKER, S. A. (1988):** Photochemistry and Photobiology 48 (4), 423  
In: Elstner, E. F. (ed.) *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Wien, Zürich
- NEUENSCHWANDER, U., VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., UKNES, S., KESSMANN, H. & RYALS, J. (1995):** Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *The Plant Journal* 8, 227-233
- NIEDERLEITNER, S., TREUTTER, D., ZINKERNAGEL, V. & FEUCHT, W. (1994):** Accumulation of flavanols in cherry leaves after infection by the fungus *Blumeriella jaapii*. *Acta Horticulturae* 381, 767-770
- NOCTOR, G. & FOYER, C. H. (1998):** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249-279
- NORITAKE, T., KAWAKITA, K. & DOKE, N. (1996):** Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology* 37, 113-116
- NÜRNBERGER, T., WIRTZ, W., NENNSTIEL, D., HAHLBROCK, K., JABS, T. ZIMMERMANN, S. & SCHEEL, D. (1997):** Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 17 (1-3), 127-136
- OERTLI, J. J., HARR, J. & GUGGENHEIM, R. (1977):** The pH value as an indicator for the leaf surface microenvironment. *Journal of Plant Diseases and Protection* 84 (12), 729-737
- OERTLI, J. J. (1986):** Exogenous application of vitamins as regulators for growth and development of plants - a review. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 150, 375-391
- OKUDA, T. (1993):** Natural polyphenols as antioxidants and their potential use in cancer prevention.  
In: Scalbert, A. (ed.) *Polyphenolic Phenomena*. INRA Editions, Versailles, 221-235
- OKUNO, S., SHIMIZU, S., ITO, T., NOMURA, M., HAMADA, E., TSUJIMOTO, Y. & MATSUDA, H. (1998):** Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (51), 34272-34277
- OLSON, P. D. & VARNER, J. E. (1993):** Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant Journal* 4(5), 887-892
- OROZCO-CARDENAS, M. & RYAN, C. A. (1999):** Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Plant Biology* 96, 6553-6557

- OTTE, O. & BARZ, W. (1996):** The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* 200, 238-246
- PACHTEN, A. & BARZ, W. (1999):** Elicitor-stimulated oxidative burst and extracellular pH changes in protoplast suspensions prepared from cultured chickpea (*Cicer arietinum* L.) cells. *Journal of Plant Physiology* 155, 795-797
- PADH, H. (1990):** Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology* 68, 1166-1173
- PENG, M. & KUC, J. (1992):** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82, 696-699
- PÜTTER, J. (1974):** Peroxydasen.  
In: Bergmeyer, H. U. (ed.) *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim
- RAAB, O. (1900):** Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* 39, 524-546
- RADI, R., RUBBO, H. & FREEMAN, B. (1995):** The double-edged action of nitric oxide on free radical-mediated oxidations. *Ciencia e Cultura (J. Braz. Assoc. Adv. Sci.)* 47, 288-296
- RAUTENKRANZ, A. A. F. (1994):** Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across membranes of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel) mesophyll cells. Dissertation ETH Zürich
- RICCI, G., BELLO, M. L., CACCURI, A. M., GALIAZZO, F. & FEDERICI, G. (1984):** Detection of glutathione transferase activity on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 143, 226-230
- RICHBERG, M. H., AVIV, D. H. & DANGL, J. L. (1998):** Dead cells do tell tales. *Current Opinions in Plant Biology* 1 (6), 480-485
- RÜEGG, U. T. & BURGESS, G. M. (1989):** Staurosporine, K-252a and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends in Pharmacological Sciences* 10, 218-220
- SAILE, H. (1999):** Vergleichende Untersuchungen zu Wirkmechanismen Induzierter Resistenz in zwei Wintergerstensorten gegenüber *Erysiphe graminis* DC. f. sp. *hordei* (EM. Marchal). Dissertation, Universität Hannover
- SANDALIO, L. M., FERNÁNDEZ, V. M., RUPÉREZ, F. L. & DEL RIO, L. (1988):** Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiology* 87, 1-4
- SANDERMANN, H. (1992):** Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biological Sciences* 17, 82-84
- SARAN, M. & BORS, W. (1994):** Signalling by  $O_2^-$  and NO: How far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under *in vivo* conditions? *Chem. Biol. Int.* 7, 213-220
- SCANDALIOS, J. G. (1993):** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101, 7-12
- SCHLEINIG, M. (1991):** Resistenzinduktion bei Gurken- und Gerstenpflanzen durch *Reynoutria*-Extrakt und Hornkiesel P501. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt

- SCHMIDT, C., SCHELLE, I., LIAO, Y. J. & SCHROEDER, J. I. (1995):** Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9535-9539
- SCHMITT, A., GÄNSEBAUER, K. H., FRITZ, I., BESTMANN, H. J. & VOSTROWSKI, O. (1998):** Physcion - ein wirksamer Inhaltsstoff aus *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 357, 160
- SCHMITZ, M. & NOGA, G. (1996):**  $\alpha$ -Tocopherol reduces environmental stress and improves fruit quality. *Second Workshop on Pome Fruit Quality, Bonn-Röttgen*
- SCHMITZ, M. & NOGA, G. (1997):** Einsatz von Vitamin E zur Streßabwehr bei *Vitis vinifera*. *Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung (pflanzliche Nahrungsmittel)*, 32. Vortragstagung Wädenswil, 351-353
- SCHNEIDER-MÜLLER, S. (1991):** Physiologische Veränderungen bei Pflanzen während der Ausbildung der induzierten systemischen Resistenz. *Dissertation, Technische Universität Darmstadt*
- SCHÖNBECK, F., STEINER, U. & KRASKA, T. (1993):** Induzierte Resistenz: Kriterien, Mechanismen, Anwendung und Bewertung. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 100, 541-557
- SCHOPFER, P. (1994):** Histochemical demonstration and localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper. *Plant Physiology* 104, 1269-1275
- SCHUBERT, K. R. & BOLAND, M. J. (1990):** The Ureides.  
In: Mifflin, B. J. & Lea, P. J. (eds.) *The Biochemistry of Plants*. Vol. 16, Academic Press, San Diego
- SCHWALB, P. & FEUCHT, W. (1998):** Affinity of flavanols to cell walls: changes after wounding, infection, lignification, and suberization. *Journal of Applied Botany* 72, 157-161
- SCOTT, R. & SLATER, T. F. (1981):** Free radical scavenging activity of (+)-catechin and other flavonoids.  
In: Slater, T. F. & Garner, A. (eds.) *Recent advantages in lipid peroxidation and tissue injury*. Brunel University, London, 233-244
- SCOTT-CRAIG, J. S., KERBY, K. B., STEIN, B. D. & SOMERVILLE, S. C. (1995):** Expression of an extracellular peroxidase that is induced in barley (*Hordeum vulgare*) by the powdery mildew pathogen (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47, 407-418
- SHIRASU, K., NAKAJIMA, H., KRISHNAMACHARI RAJASEKHAR, V., DIXON, R. A. & LAMB, C. (1997):** Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell* 9, 261-270
- SLATER, T. F. & CHEESEMAN, K. H. (1988):** In: Quintanilha, A. (ed.) *Reactive oxygen species in chemistry, biology, and medicine*. NATO ASI Series, Series A: Life Sciences 146, Plenum Press, New York
- SMIRNOFF, N. (1993):** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125, 27-58

- SMIRNOFF, N. (1998):** Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion of Biotechnology* 9, 214-219
- SMITH, J. A. & HAMMERSCHMIDT, R. (1988):** Comparative study of acidic peroxidases associated with induced resistance in cucumber, muskmelon and watermelon. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33, 255-261
- SPARRMAN, B., EHRENBERG, L. & EHRENBERG, A. (1959):** Scavenging of free radicals and radiation protection by nitric oxide in plant seeds. *Acta Chemica Scandinavica* 13, 199-200
- SPIKES, J. D. & GLAD, B. W. (1964):** Photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 3, 471-487
- SPRIBILLE, R. & FORKMANN, G. (1981):** Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of *Matthiola incana* R. Br.. *Zeitschrift für Naturforschung* 36 c, 619-624
- SPRUCE, J., MAYER, A. M. & OSBORNE, D. J. (1987):** A simple histochemical method for locating enzymes in plant tissue using nitrocellulose blotting. *Phytochemistry* 26, 2901-2903
- STADNIK, M. J. & BUCHENAUER, H. (2000):** Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazol-induced and quantitative resistance of wheat. *Review of Plant Pathology* 79 (3), 218
- STASWICK, P. E. (1992):** Jasmonate, genes, and fragrant signals. *Plant Physiology* 99, 804-807
- STAUB, T., AHL-GOY, P. & KESSMANN, H. (1992):** Chemically induced disease resistance in plants.  
In: Lyr, H. & Polter, C. (eds.) *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Symposium on Systemic Fungicides and Antifungal Compounds* 4, 239-249, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- STEIN, B. D., KLOMPARENS, K. L. & HAMMERSCHMIDT, R. (1993):** Histochemistry and ultrastructure of the induced resistance response of cucumber plants to *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of Phytopathology* 137, 177-188
- STICH, K. & EBERMANN, R. (1984):** Investigation of hydrogen peroxide formation in plants. *Phytochemistry* 23 (12), 2719-2722
- STRAUB, M. (1995):** Ausgewählte Ergebnisse einer zweijährigen Leistungsprüfung biologischer Pflanzenbehandlungsmittel an Apfelbäumen. 7. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum Ökologischen Obstbau, Hrsg. Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e. V. (FÖKO), 40-44
- STREB, P., MICHAEL-KNAUF, A. & FEIERABEND, J. (1993):** Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. *Physiologia Plantarum* 88, 590-598
- STROTHER, S. (1988):** The role of free radicals in leaf senescence. *Gerontology* 34, 151-156
- SUTHERLAND, M. W. (1991):** The generation of oxygen radicals during host plant response to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39, 79-93

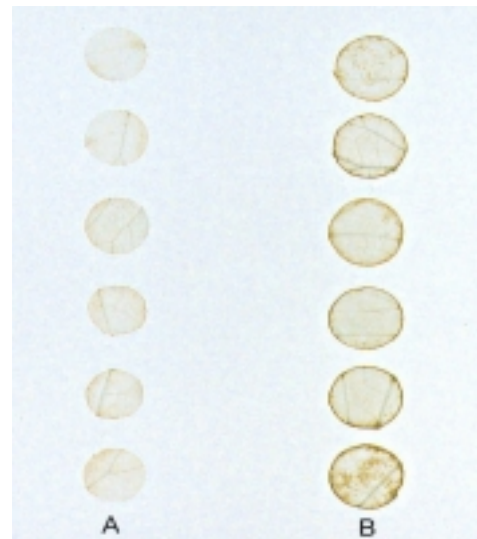
- SVALHEIM, O. & ROBERTSEN, B. (1993):** Elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- $\alpha$ -D-galacturonides and an oligo- $\beta$ -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiologia Plantarum* 88, 675-681
- TAKAHASHI, Y., HASEZAWA, S., KUSABA, M. & NAGATA, T. (1995):** Expression of the auxin-regulated *parA* gene in transgenic tobacco and nuclear localization of its gene product. *Planta* 196, 111-117
- TAMAOKI, T., NOMOTO, H., TAKAHASHI, I., KATO, Y., MORIMOTO, M. & TOMITA, F. (1986):** Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135, 397-402
- TENHAKEN, R., LEVINE, A., BRISSON, L. F., DIXON, R. A. & LAMB, C. (1995):** Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4158-4163
- THOMSEN, L. L., SARGENT, J. M., WILLIAMSON, C. J. & ELGIE, A. W. (1998):** Nitric oxide synthase activity in fresh cells from ovarian tumour tissue: relationship of enzyme activity with clinical parameters of patients with ovarian cancer. *Biochemical Pharmacology* 56, 1365-1370
- THORDAL-CHRISTENSEN, H. & SMEDEGARD-PETERSEN, V. (1988):** Comparison of resistance-inducing abilities of virulent and avirulent races of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* and a race of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in barley. *Plant Pathology* 37, 20-27
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WIE, Y. & COLLINGE, D. B. (1997):** Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11 (6), 1187-1194
- TIMOSHENKO, A. V., DUBOVSKAYA, L. V., KARVATSKAYA, O. D., ZHARKOV, V. V., ANDRÉ, S. & GABIUS, H. J. (1999):** NO-dependent regulation of lectin- and menadione-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-production by cells from pleural effusions of lung cancer patients and by immune cells. *International Journal of Oncology* 14, 793-798
- TOLBERT, N. E. (1982):** Leaf peroxisomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 386, 254-268
- TOREL, J., CILLARD, J. & CILLARD, P. (1986):** Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25, 383-385
- TUKEY, H. B. (1971):** Leaching of substances from plants.  
In: Preece, T. F. & Dickinson, C. H. (eds.) *Ecology of leaf surface microorganisms*. Academic Press, London
- URANO, S., YANO, K. & MATSUO, M. (1988):** Membrane-stabilizing effect of  $\alpha$ -tocopherol and its model compounds on fluidity of lecithin liposomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 150, 469-475
- VALLÉLIAN-BINDESCHEDLER, L., SCHWEIZER, P., MOSINGER, E. & MÉTRAUX, J. P. (1998):** Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) is associated with a burst of active oxygen species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52, 185-199
- VANACKER, H., CARVER, T. L. W. & FOYER, C. H. (2000):** Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barley powdery mildew interaction. *Plant Physiology* 123, 1289-1300



- VAN GESTELEN, P., ASARD, H., HOREMANS, N. & CAUBERGS, R. J. (1998):** Superoxide-producing NAD(P)H oxidases in plasma membrane vesicles from elicitor responsive bean plants. *Physiologia Plantarum* 104, 653-660
- VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M. & PIETERSE, C. M. J. (1998):** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36, 453-483
- VERNOOIJ, B., FRIEDRICH, L., AHL-GOY, P., STAUB, T., KESSMANN, H. & RYALS, J. (1995):** 2,6-Dichlorisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 228-234
- VIARD, M. P., SANKARI, F., MILAT, M. L., PUGIN, A., RICCI, P. & BLEIN, J. P. (1993):** Phosphorylated proteins are involved in tobacco cell early responses to cryptogein. In: Fritig, B. & Legrand, M. (eds.) *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer, Dordrecht
- WASTERNAK, C., ATZORN, R., JAROSCH, B. & KOGEL, K. H. (1994):** Induction of a thionin, the jasmonate-induced 6 kDa protein of barley by 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Journal of Phytopathology* 140, 280-284
- WEFERS, H. & SIES, H. (1988):** The protection of ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is depend on vitamin E. *European Journal of Biochemistry* 174, 353-357
- WIERINGA-BRANTS, D. H. & SCHETS, F. M. (1988):** Effect of salicylic acid and phenylserine on the hypersensitive reaction of tobacco mosaic virus. *Journal of Phytopathology* 123, 333-343
- WINTER, H., ROBINSON, D. G. & HELDT, H. W. (1993):** Subcellular volumes and metabolite concentrations in barley leaves. *Planta* 191, 180-190
- WOJTASZEK, P. (1997):** Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322, 681-692
- WOLF, G. & FRIC, F. (1981):** A rapid staining method for *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in and on whole barley leaves with a protein specific dye. *Phytopathology* 71, 596-598
- WURMS, K., LABBÉ, C., BENHAMOU, N. & BÉLANGER, R. R. (1999):** Effects of Milsana and benzothiadiazole on the ultrastructure of powdery mildew haustoria on cucumber. *Phytopathology* 89 (9), 728-736
- YAMAMOTO, M., NAKATSUKA, S., OTANI, H., KOHMOTO, K. & NISHIMURA, S. (2000):** (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* 90 (6), 595-600
- ZOBEL, A. M. & MARCH, R. E. (1993):** Autofluorescence reveals different histological localizations of furanocoumarins in fruits of some *Umbelliferae* and *Leguminosae*. *Annals of Botany* 71, 251-255

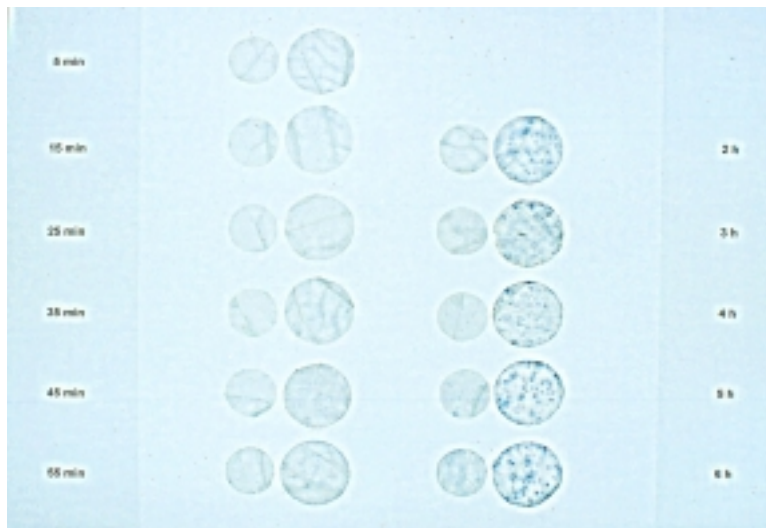
## 7 Anhang

### 7.1 Bilderverzeichnis

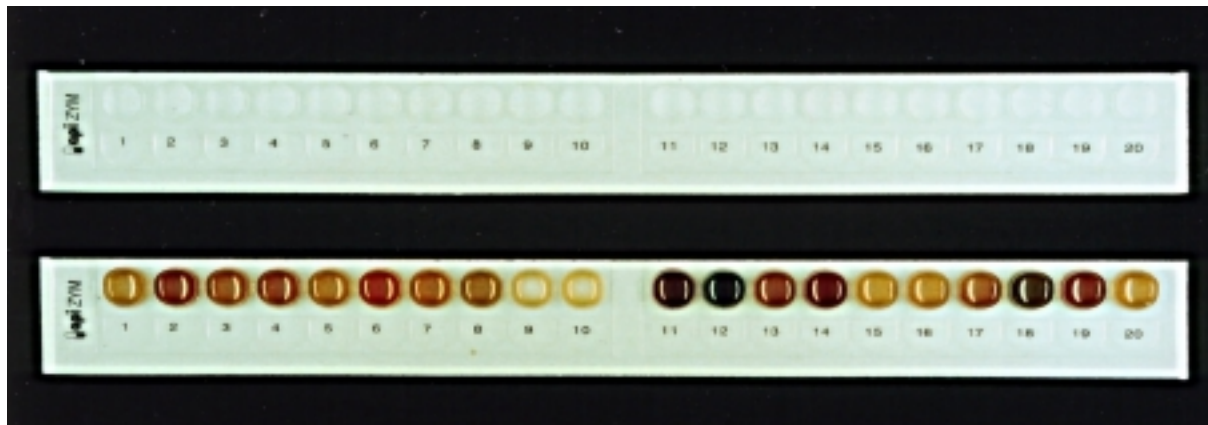


**Abb. 5 (links):**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gewebeabdruck eines Gurkenblattes nach Infiltration mit DCINA (1000  $\mu\text{M}$ ).

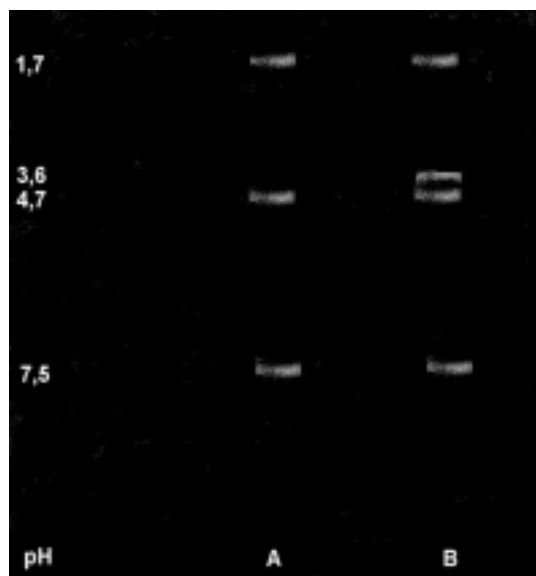
**Abb. 6 (rechts):**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Detektion in Gurkenblattgewebe nach Inkubation in A. dest. (A) oder 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (B) für 1-6 h (v. o. n. u.).



**Abb. 7:**  $\text{O}_2^-$ -Detektion in Gurkenblattgewebe nach Inkubation in A. dest. (kleiner Ø) oder 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (großer Ø) für 5-55 min und 2-6 h.



**Abb. 28:** API-ZYM-Testsystem vor und nach der Anwendung.



**Abb. 31:** Isoelektrische Fokussierung von GT-Formen in Gurken nach Behandlung mit A. dest. (A) oder 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (B).

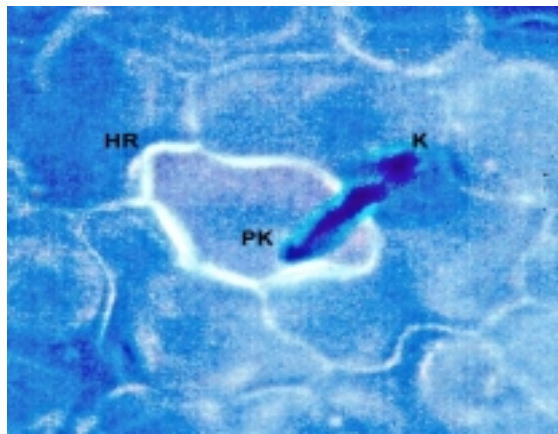
⇒ Seite 125:

**Abb. 34:** Abwehrreaktionen der Epidermiszelle in Gurkenblattgewebe gegen *S. fuliginea* nach Applikation von 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (**A** = autofluoreszierende HR-Zelle; **B** = HR-Zelle mit  $H_2O_2$ -Nachweis; **C** = Komplex HR + Papille mit  $H_2O_2$ -Nachweis; HR = Hypersensitive Reaktion, K = Konidie, P = Papille, AKS = appressorialer Keimschlauch).

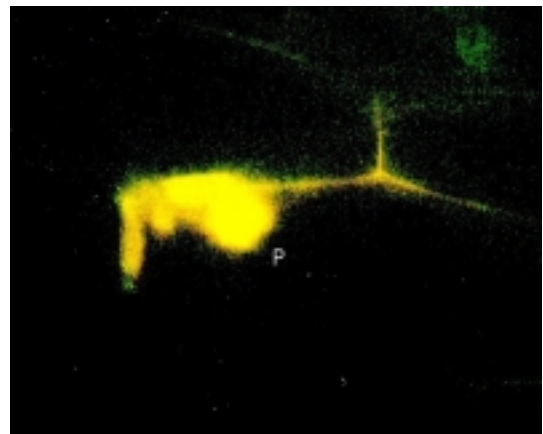
**Abb. 36:** Abwehrreaktion der Epidermiszelle im Gerstenkoleoptilensystem gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* (P = autofluoreszierende Papille unter Blaulichtanregung).

**Abb. 37:** Abwehrreaktion der Epidermiszelle im Gerstenblattgewebe gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* (Papille mit  $H_2O_2$ -Nachweis, Blaufärbung durch Bildkonvertierung).

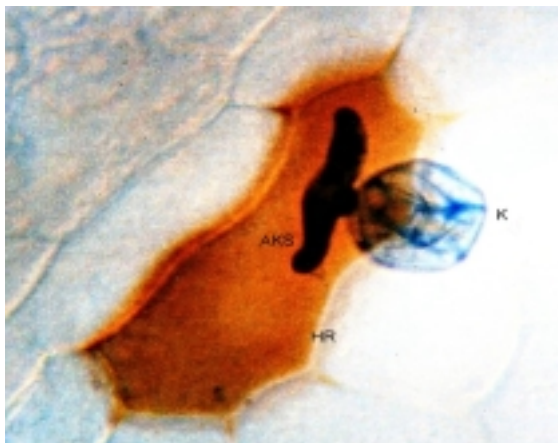
**Abb. 38:** Abwehrreaktion der Epidermiszelle im Gerstenblattgewebe gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* (HR-Zelle mit  $H_2O_2$ -Nachweis).



34 A



36



34 B



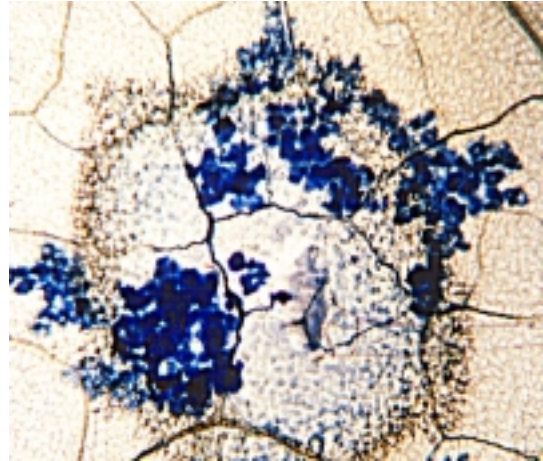
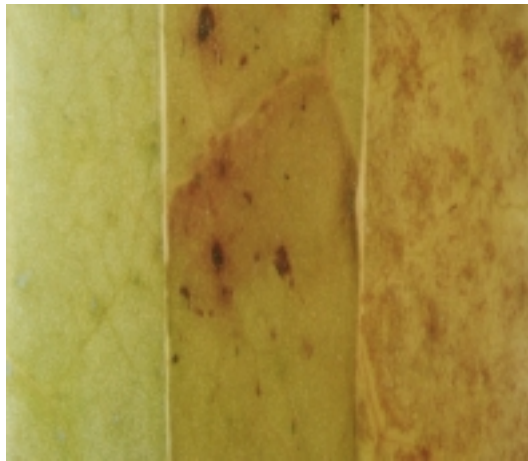
37



34 C



38



**Abb. 40 (links):** Detektion von nekrotisiertem und vitalem Gurkenblattgewebe nach Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (links), 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (mittig) oder A. dest. (rechts).

**Abb. 41 (rechts):** Zelltod-Detektion von Gurkenblattgewebe nach Applikation von 1 % *Reynoutria sachalinensis*-Extrakt (1,6 x 5fache Vergrößerung).



## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
ARS	antioxidative response system antioxidatives Verteidigungssystem
APOX	Ascorbatperoxidase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BABA	$\beta$ -Aminobuttersäure
BSA	bovines Serumalbumin
BTH	Benzothiadiazol
CAT	Katalase
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
DCIP	2,6-Dichlorophenol indophenol
DCSA	3,5-Dichlorsalicylsäure
DHR	Dihydrorhodamin 123
DMAZA	4-Dimethylaminozimtaldehyd
DMF	N, N-Dimethylformamid
DPI	Diphenyliodoniumchlorid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGME	Ethylenglycolmonomethylether
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GPOX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GSR	oxidiertes Glutathionderivat
GT	Glutathion-S-Transferase
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HR	Hypersensitive Reaktion
IPAZ	Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IR	Induzierte Resistenz
ISR	induced systemic resistance induzierte systemische Resistenz
KF	Keimfähigkeit
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
Ix	Lichtintensität Lux
M	molar
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid
n	Anzahl der Wiederholungen (Statistik)

---

NAD(H)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduziert
NAD(P)	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat, reduziert
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxidsynthase
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OH•	Hydroxylradikal
PCD	programmed cell death programmierter Zelltod
PMS	Phenanzinmethosulfat
ppm	parts per million
POX	Peroxidase
PR-Proteine	pathogenesis-related protein
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ROS	reactive oxygen spezies reaktive Sauerstoffspezies
<i>R. s.</i>	<i>Reynoutria sachalinensis</i>
<i>R. s. mod.</i>	<i>Reynoutria sachalinensis</i> modifiziert
s	Sekunde
SA	Salicylsäure
SAR	systemic acquired resistance systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)ethansulfonsäure
TS	Trockensubstanz
U	Unit (Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
v	Volumen
w	Gewicht
WG	wasserdispergierbares Granulat Wirkungsgrad
WP	wasserdispergierbares Pulver
μM	mikromolar

### 7.3 Geräteliste

Autoklav : Integra Biosciences, Hersteller Fedegari, Typ FVS 2, Fa. Tecnomara

Binokular : Typ Stermi SV 11 mit Kameraaufsatz MC 100, Kaltlicht, Fa. Zeiss

Chromatographie-Säule : Länge 20 cm, Ø 1 cm, Glasfritte mit Porengröße 0,  
Fa. Fisher Scientific

Gelmatrix : fractionation range (globular proteins 1000-5000; dextran 100-5000)  
dry bead diameter (50-150 µm); bed volume (4-6 ml / g)

Elektroden : I) Flachbodenelektrode Fa. Orion Research, Inc., Beverly,  
USA  
II) Mettler Toledo, Typ InLab 408/120

Elektrophorese : IEF, Fa. Pharmacia  
Kälte-Umwälzthermostat F 25-MP, Fa. Julabo

Homogenisator (Ultra turrex) : Reax 2000, Fa. Heidolph

Inkubationsschrank : Fa. Memmert

Klimaschrank : Fa. Rubarth Apparate GmbH

Luxmeßgerät : Luxmesser LM 1010, Fa. Elvos

Mikroskope : I) Diaplan, Halogen 100 Watt, Anregung 100 Watt,  
Filterblock H 3 bestehend aus einem Anregungsfilter im Blaulicht (390-490 nm),  
einem Teilerspiegel, welcher Blaulicht über 510 nm reflektiert, und einem  
Sperrfilter, den nur Wellenlängen  $\geq 525/20$  nm passieren, Kameraaufsatz  
Minolta X-700, Fa. Leitz  
II) Axioskop 2, Halogen 100 Watt, HBO 100 Watt,  
Anregungsfilter (G 365 nm), Teilerspiegel (FT 395 nm), Sperrfilter (LP 420 nm),  
Kameraaufsatz MC 80 DX, Fa. Zeiss

Mühle : Typ ZM 1000, Siebgröße 4,0 mm, Leistung 15000 U / min, Fa. Retsch

pH-Meßgerät : Microprocessor pH-Meter, Fa. WTW Typ 537

Photometer : I) Spectronic Genesys 5, Fa. Milton Roy  
II) Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments

Rotationsverdampfer : Paralaqua, Fa. Van der Heijden  
Wasserbad B-480, Fa. Büchi

Rührer : I) Laborkocher Typ SLK 1-6, Fa. Schott  
II) MR 2002 (1500 U/min), Fa. Heidolph  
III) KMO 2 (1100 U/min), Fa. Janke & Kunkel

Sterilbank : Clean Air, Typ CA / REV 4

Ultraschallbad : Sonorex Super 10 P, Fa. Bandelin

Waagen : I) Feinwaage Typ AE 163, Fa. Mettler  
II) Grobwaage Typ 1212MP, Fa. Sartorius



Wasserbad : Typ SW-20, Fa. Julabo

Zentrifugen : I) Tischzentrifuge 5417 R, Fa. Eppendorf  
II) Ultrazentrifuge Typ J 2-21 M/E, Fa. Beckman  
Festwinkelrotor JA 20

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.-W. Dehne danke ich ganz besonders dafür, daß er meiner Arbeit und ihrer Thematik ein großes Interesse entgegenbrachte und mir ein hohes Maß an Selbständigkeit bei der Durchführung des gesamten Projektes gewährte.

Dem Präsidenten der Biologischen Bundesanstalten für Land- und Forstwirtschaft Herrn Prof. Dr. F. Klingauf möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Noga für die Übernahme des Korreferates und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. W. Ullrich, Herrn Prof. Dr. J. Huber und Frau Dr. A. Schmitt möchte ich recht herzlich danken für die zahlreichen Diskussionen, Anregungen, Hilfestellungen und Korrektur der Arbeit. Als Vertreter der Technischen Hochschule Darmstadt und der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Darmstadt waren sie mir eine sehr gute und persönliche Stütze.

Ein weiterer Dank gilt Frau PD Dr. U. Steiner-Stenzel für die korrigierende Durchsicht seitens der Universität Bonn.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes, welches im Rahmen des Schwerpunktprogrammes 322 716 "Mechanismen der Interaktion im System Pflanze, Schaderreger und Nutzorganismen" bewilligt wurde (Forschungsberichte Hu 369/4-3/4 und Ul 25/14-4/5).

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dipl. Biol. Katja Moch bedanken, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit zu meiner Dissertation beigetragen hat. Ihre Anwesenheit im Labor war in Hinblick auf Diskussion und Arbeitsatmosphäre eine Bereicherung.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für biologischen Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Darmstadt und bei den Doktoranden des Institutes für Pflanzenkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn für die vielen Kleinigkeiten, die das Doktorandenleben so mit sich bringt.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinem Verlobten Dr. med. vet. Theodor Schulze-Horsel, der stets Verständnis für mich und meine Forschungsmaterie hatte und mir computertechnische Hilfestellungen bei der Anfertigung der Dissertationschrift gab.

Meinen Eltern ein großes Dankeschön für alles Andere. Ohne sie wäre ich nicht da angelangt, wo ich jetzt stehe.